

青海省部分地区冬虫夏草遗传多样性 RAPD 分析

中文摘要



冬虫夏草为传统名贵中药材。冬虫夏草资源在青海省的分布区主要是在青南高原的玉树、果洛二州，在青海中部也有分布。本论文采用 RAPD 分子标记技术对青海省不同产地的 20 份冬虫夏草样品进行了多态性分析和聚类比较，从而为我省冬虫夏草资源在遗传多样性保护，分类研究，遗传图谱构建等方面积累了资料，为其他药用物种进行 RAPD 实验提供参考和借鉴。通过研究，取得了以下进展：

1.对分别用 SDS 法、改良 CTAB 法两种方法提取的冬虫夏草基因组 DNA，进行电泳检测和紫外分光光度的检测。结果表明两种方法均可获得完整的冬虫夏草基因组 DNA，但是改良 CTAB 法提取的冬虫夏草 DNA 质量较好，电泳检测的谱带清晰稳定，无降解。同时采用改良 CTAB 法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值相对较好，间于 1.6-2.0 之间，说明 DNA 质量较好。因此，通过以上 2 种方法的对比可以选择了改良的 CTAB 法进行冬虫夏草 DNA 基因组的提取。

2.实验对 PCR 反应体系中 5 个重要因子进行了正交试验，筛选出最优的反应体系，并在此最优体系的基础上，分别对退火温度、扩增循环数进行了单因素试验，得到了 RAPD 反应合理的热力学程序，确定了一套优化的冬虫夏草 RAPD 反应体系和 PCR 扩增条件。通过正交试验得到了冬虫夏草 RAPD-PCR 的最佳扩增体系为：20 μ l 总反应体系中包含，35 ng 模板 DNA，2.0 U Taq 酶，0.4 μ mol/L 引物，0.2 mmol/L dNTPs，1.5 mmol/L Mg^{2+} 。其热循环程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 之后进行 40 次循环，94 $^{\circ}$ C 变性 60 S，37 $^{\circ}$ C 退火 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min，保存于 4 $^{\circ}$ C。

3.用40个随机引物对20份冬虫夏草样品进行了RAPD分析，成功地筛选出了9个适合于冬虫夏草RAPD分析的随机引物，这些引物可以扩增出丰富清晰的条带。这9个引物进行PCR扩增后，共检测到65个位点，平均每条引物检测到7.2个位点，其中呈多态性位点57个，平均多态性条带数为6.3 条，多态性位点比率P为87.69%，9个引物的多态位点比率从75%--100%不等。

4. 根据随机引物对20个冬虫夏草样品的扩增结果构建0/1矩阵，在NTSYS软件上计算出各品种间的相似系数，品种间的相似系数决定了品种间的亲缘关系，相似系数越大，亲缘关系越近。20个冬虫夏草样品间的相似系数介于

0.1818-0.9876之间。其中样品18和20的相似系数最大为0.9876，表明两者亲缘关系最近。聚类分析结果表明：五个样地的20个样品，每个样地的样品均聚在一类，表明相似系数与样品的地理位置密切相关。

关键词：冬虫夏草，遗传多样性，RAPD，相似系数

In Some areas of Qinghai *Cordyceps sinensis* RAPD analysis of genetic diversity

Abstract

Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc is a Chinese traditional medicinal fungus. The *Cordyceps sinensis* resources in Qinghai Province's distribution area are mainly south the plateau Yushu, Guoluo two states, also has the distribution middle Qinghai province. RAPD technique is used in analyzing the genetic diversity of 20 samples from five different regions of Qinghai province, the results would reveal the genetic background of *Cordyceps sinensis* of Qinghai Province and provide the basic information for protection and evaluation, use of germplasm resources. The major findings are as follows:

1. Two methods--SDS method and improved CTAB method were used to extract genomic DNA from *Cordyceps sinensis*. The DNA samples of two methods were tested by agarose gelelectrophoresis and spectrophotometer. The result was that the two methods could be used for extracting genomic DNA from *Cordyceps sinensis*, and that the improved CTAB method was the best ones through which the production had the highest purity. The OD_{260}/OD_{280} was better by improved CTAB method, Between in 1.6-2.0. so, we choice the improved CTAB method for extract genomic DNA.

2. In the experiment, five essential factors which may affect the result of RAPD were optimized by orthogonal experiment and two single factor experiments of annealing temperature and cycle times. The result showed that the optimal conditions of RAPD-PCR system and reaction parameters were 20 μ l Total reacting system: 35ng template DNA, 2.0 U Taq enzyme, 0.4 μ mol/L random primer, 0.2mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , The reaction procedure was 95 $^{\circ}C$ in 3 min, then 40 cycle times with 94 $^{\circ}C$ in 60 s, 37 $^{\circ}C$ in 1 min, 72 $^{\circ}C$ in 2 min, lastly 72 $^{\circ}C$ in 5 min, and stop reaction at 4 $^{\circ}C$.

3. There were 40 random primers used for the PCR amplification of 20 genomic DNA fragment. Nine of the primers could amplify polymorphic bands, Altogether 65 were amplified, Every primer could amplify an average of 7.2 bands, And in there

bands Include 57 bands, Polymorphism position spot ratio accounts for 87.69%. Every primer could amplify an average of 6.3 polymorphic bands, Nine of the primers could amplify Polymorphism position spot ratio of 75%-100%.

4. According to random primer pairs of 20 samples of *Cordyceps sinensis* results build 0/1 matrix and use the software NTSYS to calculate similarity coefficients between all varieties which determines the genetic relationship between the two species, the greater the similarity coefficient, the closer genetic relationship. The value of the similarity coefficients of 20 samples were 0.1818 to 0.9876. The similarity coefficient between num 18 and num 20 is the largest of all that means the closest relationship between the two. Cluster analysis showed that: five plots of 20 samples; each sample plot of the samples were gathered in a class, indicating similarity coefficient is closely related to the sample location.

Key words: *Cordyceps sinensis*, RAPD, Genetic diversity, Similarity coefficient, similarity coefficients

目 录

中文摘要	I
Abstract	III
前 言	1
第一章 综 述	2
1.1 遗传多样性的研究进展	2
1.1.1 形态学标记	2
1.1.2 细胞学标记	3
1.1.3 基于生化水平的蛋白质标记	4
1.1.4 分子标记	5
1.1.4.1 限制性片段长度多态性技术	6
1.1.4.2 rDNA-ITS 片段序列分析法	6
1.1.4.3 简单序列重复区间扩增多态性	7
1.1.4.4 扩增片段长度多态性	7
1.1.4.5 随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术	7
1.1.4.6 RFLP、RAPD、ISSR、AFLP 四种分子标记技术的特点对比	9
1.2 冬虫夏草的研究进展	9
1.2.1 冬虫夏草的化学成分	9
1.2.1.1 虫草多糖	10
1.2.1.2 氨基酸和蛋白质	10
1.2.1.3 脂肪和脂肪酸	10
1.2.1.4 糖醇和甾醇类	10
1.2.1.5 抗菌活性物质	10
1.2.1.6 虫草素和生物碱	11
1.2.1.7 其他成分	11
1.2.2 冬虫夏草生物学特性	11
1.2.2.1 感染	11
1.2.2.2 生长	11
1.2.2.3 形态	12
1.2.2.4 分布	12
1.2.3 RAPD 技术在冬虫夏草中的应用	12
1.2.3.1 构建遗传指纹图谱	12
1.2.3.2 品种鉴别的研究	13
1.2.3.3 遗传多样性和遗传分化研究	13
1.3 本实验研究内容	14
1.3.1 本实验的研究内容主要包括以下几个方面	14
1.3.2 拟解决的关键问题	14
第二章 材料与方 法	15
2.1 样品的选取	15
2.2 试剂与仪器	15
2.2.1 主要试剂	15
2.2.2 试剂的配置和准备	16

2.2.3 主要仪器	17
2.3 实验方法	17
2.3.1 冬虫夏草基因组 DNA 的提取, 纯化以及检验	17
2.3.1.1 基因组 DNA 提取	17
2.3.1.2 DNA 模板纯度和浓度的测定	18
2.3.2 RAPD-PCR 体系优化	20
2.3.2.1 正交优化设计	20
2.3.2.2 单因子因素-退火温度的试验	20
2.3.2.3 单因子因素-循环次数的试验	21
2.3.2.4 引物的筛选	21
2.3.3 进行 RAPD-PCR 扩增	22
2.3.4 RAPD 扩增产物观察	22
2.4 数据的统计与分析方法	22
2.4.1 数据的统计	22
2.4.2 统计数据的分析	23
2.4.2.1 遗传数据计算方法	23
2.4.2.2 聚类软件使用方法	23
第三章 实验结果与分析	25
3.1 冬虫夏草基因组 DNA 提取方法的比较与分析	25
3.1.1 电泳检测	25
3.1.2 紫外分光光度法的检测	25
3.2 DNA 浓度和纯度的检测	26
3.2.1 琼脂糖凝胶电泳检测	26
3.2.2 紫外分光光度法的检测结果	26
3.3 最佳 PCR 扩增反应体系的建立	27
3.3.1 正交试验的结果分析	27
3.3.2 退火温度的筛选结果	29
3.3.3 循环次数的筛选结果	29
3.3.4 最终 PCR 扩增体系	30
3.3.5 最终 PCR 反应程序	30
3.4 RAPD 扩增结果与分析	31
3.4.1 引物的筛选结果	31
3.4.2 部分 RAPD 结果统计 0, 1 矩阵和引物扩增图谱	31
3.5 相似系数, 遗传距离和聚类分析	34
第四章 讨论	37
4.1 基因组 DNA 的提取与纯化	37
4.2 RAPD-PCR 的优化条件	38
4.3 RAPD 扩增结果的统计与聚类分析	40
第五章 结论	41
参考文献	42
致谢	46
个人简历	47
在学期间发表的学术论文	48

前 言

冬虫夏草为传统名贵中药材之一。冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)^[1]属于真菌门(*Eumycota*)、子囊菌亚门(*Ascomycotina*)、核菌纲(*Pyrenomyceres*)、麦角菌目(*Clavicipitales*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)的虫草属(*Cordyceps*)^[2]。

冬虫夏草为冬虫夏草菌寄生在蝙蝠科昆虫蝙蝠蛾(*Hepialus armoricanus oberthur*), 越冬幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体。其名曰: 冬则为虫, 夏则为草, “虫”已不是虫, 虫体早已成了虫草菌的养分, 乃为菌核, 外表仅具有虫状; “草”是虫草菌的子座, 出土的子座上部圆柱形, 内有子囊壳, 其中产生许多子囊和子囊孢子^[3]。它没有繁茂的枝叶, 又不能开出鲜艳的花朵, 由此虫草既不是“冬为虫, 夏变草”, 也不是“既是虫, 又是草”, 而是虫草菌和寄主昆虫的“结合体”。主产于四川、青海、西藏、云南、贵州等海拔 4000-5100 m 的山中^[4]。

近年来, 冬虫夏草对肺、肾疾病的治疗及调节免疫、预防保健等方面的作用得到肯定^[5]。虫草的营养价值也很高。每百克虫草含有蛋白质 25 g, 脂肪 8.4 g, 碳水化合物 28.9 g, 粗纤维 18.5 g, 游离氨基酸 12 种, 水解氨基酸 18 种, 并含有无机元素、虫草酸、虫草素、维生素 B₁₂、六碳糖醇、生物碱等营养成分^[6]。近年来, 人们对健康的要求愈加重视, 冬虫夏草则以其治疗和保健效果而吸引国内外消费者的更大关注。青海省的野生冬虫夏草资源主要分布在青南高原的玉树、果洛二州, 占全省天然冬虫夏草产量的 85 % 以上。本实验将运用分子生物学技术对青海省部分地区的冬虫夏草遗传多样性进行研究。

应用分子生物学技术研究物种遗传多样性是现代生物多样性研究的热点之一。到目前为止, 有关冬虫夏草分子生物学研究及分子水平的遗传多样性的研究工作报道多数集中于形态学、生态学和生活史等方面^[7-8]。本实验所采用的是随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术, 从 DNA 水平上对类群比较分析, 确定品种间的亲缘关系, 绘制亲缘关系聚类分析树状图。实验的目的是为了能够了解青海省冬虫夏草的遗传多样性背景。并且能较好的反映青海省不同地区冬虫夏草资源亲缘关系的远近, 青海省冬虫夏草资源的遗传学距离。有助于我们在一定程度上解释青海省冬虫夏草的道地性。在遗传多样性保护, 分类研究, 遗传图谱构建等方面积累资料, 为其他药用物种进行 RAPD 实验提供参考和借鉴。

第一章 综述

1.1 遗传多样性的研究进展

遗传多样性(Genetic diversity)又称为基因多样性。广义上讲,遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和,包括不同物种间以及物种内的遗传变异^[9]。狭义上讲,遗传多样性是指种内基因的变化,包括物种内显著不同的种群间以及同一种群内部的遗传变异程度的总和,即遗传多态性程度^[10]。在一般情况下,遗传多样性是指狭义的概念。种内多样性是物种以上各水平多样性的重要来源^[11]。种内遗传变异的来源主要有突变、重组和染色体畸变,其中最根本的是突变,它是所有生物多样性产生的根源。这种变异致使生物在种群水平、组织和细胞水平以及分子水平上表现出遗传多样性,并直接影响到变异水平的高低及变异的分布格局,即种群的遗传结构^[12]。遗传变异是决定物种可能具备的抵御外界的不良环境能力的重要因素,一个物种的稳定性和进化潜力依赖于其遗传多样性,而物种的经济和生态价值也依赖于其特有的基因组成^[11]。由此可见,遗传多样性的分析和研究有助于揭示生物界各种不同层次之间的遗传分化,物种间不同种群的亲缘关系,能确保生物多样性的合理的有效的利用以及生物多样性的可持续性发展的能力。

现在国际上的学者公认为稳定有效的遗传标记(Genetic markers)是研究遗传多样性的主要方法。遗传标记是生物体特有的性状或物质,指与目标性状紧密连锁,同该性状共分离且易于识别的可遗传的等位基因的变异^[13]。通过遗传标记就可以客观地反映出物种个体或群体间的遗传变异情况和规律。但是由于遗传变异一般都发生在分子水平上,故检测技术的难度较高。到今天遗传标记的发展经历了四个阶段,形态学标记(Morphological markers)、细胞学标记(Cytological markers)、基于生化水平的蛋白质标记(Protein markers)和现阶段的分子标记(Molecular markers)^[14]。无论采用什么标记技术,其目的都是为了从不同层次揭示遗传变异的情况,都能从各自的角度提供有价值的信息。

1.1.1 形态学标记

形态学标记是指那些可以利用肉眼或借助简单测试就可以识别的能明确的呈现出物种的遗传多样性,并且在遗传结构上比较稳定,较难受到外界环境的影响的性状。典型的形态学标记是可以直接用肉眼识别和观察的^[15]。如冬虫夏草的子座直径、长度等可以轻易识别的性状。这些性状可以结合野外调查、标

本采集、移栽和子代测定等手段,采用科学的数学方法进行统计和分析。因此从形态学或表型性状来检测遗传变异是最直接也最简便易行的方法。温学森等^[16]选取 7 个典型的地黄栽培品种,在相同的条件下栽培,在花期和果期测量 11 个形状的大小,对测量数据进行统计学处理,发现个品种间花果数量性状差异显著,并对 17 个测量数据和性状进行了聚类分析,揭示了这 7 个品种间的亲缘关系。梁洪卉等^[17]根据冬虫夏草子座直径、长度等形态性状数据得出结论,认为青海省的冬虫夏草大致分成 3 个组,即分别产于环青海湖地区、青海中东部和南部。

但是,由于基于形态性状来研究特定的物种有一定缺点且不可靠^[11],而且由于形态或表型性状数量较少,表型和基因型之间存在着基因表达、调控、个体发育等复杂的中间环节,且易受外界环境条件、人为因素等的影响,往往会有表征性状相同但遗传物质不同或表征性状不同而遗传物质相同的情况存在。因此单纯依据形态学标记来反映物种的遗传多样性是不够准确和完善的。

1.1.2 细胞学标记

细胞学标记是利用不同的细胞学特征来反映物质的遗传多样性。Merrell 认为,任何生物的天然种群中都存在着或大或小的染色体变异,这些变异在进化中起着重要的作用^[18]。染色体结构特征和数量特征是常见的细胞学标记。他们分别反映了染色体结构上和数量上的遗传多态性。前者主要是染色体核型和带型等,核型特征主要是指染色体的长度、着丝粒的位置和随体的有无等,由此可以反映染色体的缺失、重复、倒位和易位等遗传变异;而带型特征是指染色体经特殊染色显带后,染色体上显示出条带的宽窄、位置顺序和颜色深浅等,由此可以反映常染色质和异染色质分布的差异。染色体的数量特征是指染色体数目的多少,包括整倍体和非整倍体,前者如多倍体,后者如缺体、单体、三体等非整倍体。用具有染色体数目和结构变异的材料与染色体正常的材料进行杂交,其后代常导致特定染色体上的基因在减数分裂过程中的分离和重组发生偏离,由此可以测定基因所在的染色体及其相对位置。因此染色体结构和数目可以作为一种遗传标记^[19]。石大兴^[20]对引种墨西哥辣椒核型进行了分析,与国产辣椒品种比较发现核型差异较大。王正询等^[21]对芭蕉属正蕉组内 7 种野生蕉和 11 种栽培蕉进行了核型分析,认为 Simmonds 的分类系统侧重于形态,与染色体组的构成并无必然的对应关系,香蕉的进化是多元的。

细胞学标记虽然可以克服形态标记的某些不足,但是细胞学标记所需的材料需要花费较大的人力和较长的时间来培育,同时,某些物种对染色体数目和

结构变异的反应敏感，容易死亡，有些适应变异的能力较差。而且由于受染色体制片技术和分辨率的限制，核型分析应用于大量材料的遗传多样性的研究还有一定的难度^[22]。这样一来耗费的人力物力比较大，就限制了细胞学标记的在遗传多样性研究中的应用。

1.1.3 基于生化水平的蛋白质标记

基于生物体内生化性状为遗传标记的有很多种，主要包括血型标记、血清蛋白标记和同工酶标记等^[23]，其中应用最为广泛的就是蛋白质标记。蛋白质标记通常可以分为酶蛋白质和非酶蛋白质两种。在非酶蛋白质中，应用比较多的是种子储藏蛋白，储藏蛋白主要分为四类：白蛋白，球蛋白，醇溶蛋白和谷蛋白。不同的品种由于遗传组成不同，其蛋白质在种类，数量，大小以及结构等方面的不同，可以通过电泳区别出不同的蛋白质图谱，从而能够用于物种的鉴定和遗传多样性的研究。吴若菁^[24]以马尾松的胚乳为材料，证实了马尾松种子储藏蛋白存在遗传多样性，通过分株测定，共检测60株，每株检测6-10粒种子的胚乳，共获得426个有效样品，发现该天然马尾松林中存在有26种类型的醇溶蛋白图谱，群体内的杂合单株的醇溶蛋白图谱的表型分离，经扩增检验，符合孟德尔1:1的分离比。这种方法稳定性，重复性好，有很强的实用性。但是由于储藏蛋白具有种的特异性，因此很难区分亲缘关系较近的样品。

酶作为遗传标记是在Markert和Moller提出同工酶的概念后迅速发展起来^[25]。同工酶是指催化同一化学反应，而酶蛋白的分子结构不同的一组酶。它们彼此在氨基酸序列、底物的亲和性等方面都存在着差异。这种蛋白质的多样性，可能是由于基因编码的氨基酸序列的差异引起，也可能是同一基因经过不同的剪接加工过程引起。根据电荷性质的差异，通过蛋白质电泳或色谱技术及染色反应显示出同工酶的不同形式，从而反映不同的基因型。同工酶分子结构存在差异，分子大小形状不同，在特定PH值条件下所带电荷数量及性质不同，电泳时在凝胶载体中具有不同的迁移率和迁移方向。经染色处理后，特定的酶可以显示出特异的酶带色斑。同工酶的组成由遗传因素决定，是基因表达的产物，具有完全表达、共显性表达的特点，而且受外界环境干扰较弱，实验程序简单，易操作，成本较低，比形态学标记更能提供较大的差异信息。所以同工酶作为一种遗传标记已经被广泛用于种质资源的鉴定，生物遗传多样性研究，生物进化，种系发生及遗传定位等方面。黄剑波等^[26]对泰国香蕉B9、巴西BS、威廉斯818和粉蕉组培生根苗进行了过氧化物酶的检测分析，发现香蕉4个不同品种组培苗根中过氧化物同工酶共有8条酶带，可分为I，II，III区，有共同的特征酶带，可作这些香蕉品种的鉴

定酶带,同时,每一个香蕉品种又有特征酶带,利于同工酶水平条件下鉴定香蕉品种。周厚高等^[27]利用9个等位酶系统的14个基因位点的等位基因资料对8个百合品种的遗传组成进行了分析,并探讨了品种间的亲缘关系,同时还利用等位酶分析技术,检测了新铁炮百合自交初代各株系的遗传多样性与遗传分化。

蛋白质是基因表达的产物,与形态性状、细胞学特征相比,数量上更丰富,受环境影响比较小,而且实验材料来源多,操作简单,结果容易进行比较,能更好地反映遗传多样性,因此蛋白质标记是一种比较好的遗传标记,已被广泛应用于研究遗传多样性的各个领域,也是检测遗传多样性的最普遍的方法手段。但是蛋白质标记仍有其局限性:(1)仍在不同程度上受到环境和发育过程的影响,(2)只能用于检测编码特定酶蛋白的基因,其他不参与编码蛋白的基因或参与编码的蛋白无法提取的基因,以及部分变异隐蔽的基因都无法检测,(3)标记检测的位点数目有限,无法提供大量的信息,(4)样品质量的高低直接影响到同工酶的稳定性。所以随着技术的发展,分子标记将会占据遗传标记的主导地位,成为种群遗传学、系统分类学、生物多样性、基因表达与调控各个领域研究的主要手段。

1.1.4 分子标记

近年来,随着生命科学的不断发展,分子遗传标记技术在中药材领域中日益渗透,在分子水平上检测基因多样性分子标记的中药鉴定方法得到不断的发展与应用,分子标记是以生物大分子,尤其是生物体的遗传物质——核酸的多样性为基础的遗传标记。近几年来,直接检测 DNA 的分子标记技术得以迅速发展和应用。与传统的形态标记、细胞标记和蛋白质标记相比,分子标记具有以下优点:(1)直接以 DNA 的形式表现,在植物体的各种组织、各发育时期均可以检测到,不受季节、环境限制,不存在表达与否的问题;(2)数量极多,遍及整个基因组;(3)多态性水平高,自然存在着许多等位变异,不需要专门创造特殊的遗传材料;(4)表现为“中性”,即不影响目标性状的表达,与不良形状无必然的连锁;(5)许多分子标记表现为共显性,能够鉴别出纯合基因型和杂合基因型,提供完整的遗传信息^[28]。目前 DNA 分子标记已广泛应用于种质资源研究、遗传图谱构建、目的基因定位和分子辅助选择等各个方面。其中新方法、新技术不断涌现,而随着 DNA 多聚酶链式反应(PCR)技术的出现,许多新型的分子标记运用而生。根据多态性检测手段的不同可将其分为三类:基于 Southern 杂交技术的分子标记,如 RFLP;基于 PCR 反应的分子标记, RAPD、PCR 与 RFLP 结合产生的 AFLP 标记等;还有直接的片段序列测序^[29]。当前应用比较广泛的分子标记主要有显性标记

RAPD、ISSR、AFLP。

1.1.4.1 限制性片段长度多态性技术

所谓限制性片段长度多态性技术(Restrictive fragment length polymorphisms RFLP), 是基于 Southern 杂交的技术, 是指用限制性内切酶切割不同个体基因组 DNA 后, 含同源序列的酶切片段在长度上有明显差异。将这些大小不等的片段通过凝胶电泳时就形成不同的带, 用分子探针杂交并利用放射自显影在感光底片上成像, 就会找出不同的位置, 呈现出多态性。是 1990 年由美国杜邦公司的 J.G.K Williams 等人建立起来的第二代分子标记技术^[30]。RFLP 技术运用于植物抗性研究还只是近几年的事, RFLP 能对植物的抗性基因进行定位和分离, 利用 RFLP 技术, 对于核基因组或叶绿体基因组、尤其是后者, 若能提取纯净 DNA, 则可直接从酶切后的电泳图谱看出其多态性, 利用这一方法可以测定种群内、种群间不同水平的物种在污染环境抗性分化进化水平上的差异^[31-32]。

俞和韦等^[33]用 RFLP 方法分析贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌的多样性, 分别用 Msp I、HaeIII 和 Taq I 对 205 个阳性克隆的质粒酶切指纹图谱分析, 结果显示有 23 个不同的 RFLP 操作分类单元。为冬虫夏草人工繁育提供基础信息, 同时也为相关的昆虫肠道或其它环境中的真菌多样性及昆虫与微生物协同进化关系研究提供理论依据。获得更多更全面的冬虫夏草多样性信息。

1.1.4.2 rDNA-ITS 片段序列分析法

在 rDNA 基因中, 16S rDNA 和 23S rDNA 基因间隔序列称为(ITS), 它的长度和序列变化较大。ITS 序列的分子生物学方法采用保守的引物 ITS1、ITS 对 rDNA 的 IST 区域进行 PCR 扩增。产物经纯化后, 对 ITS 进行测序, 比较两者碱基序列的相似性^[34], 可用于对细菌的不同生物型、菌株、种、属进行分类鉴定。甚至用于区分关系非常近的种。

章卫民等^[35]从西藏采集的冬虫夏草子实体中分离出 3 个菌株 C₃、C₄、C₅, 通过培养特征的研究以及采用分子生物学方法, 以 rDNA-ITS 区为分子指标, 与冬虫夏草的有性世代及中国被毛孢进行比较分析, 发现 C₄ 的培养特征与 C₃、C₅ 完全不同, 其序列与冬虫夏草的相似率为 93 %, 与中国被毛孢的相似率为 94 %, 而 C₃、C₅ 与冬虫夏草的相似率很低(分别为 55 %和 69 %), 从而证明 C₄ 是西藏冬虫夏草的无性型, 为中国被毛孢。

魏鑫丽等^[36]对内群和外群样品的 nrDNA 间隔区(ITS)碱基序列进行了测定; 对于测定的 8 条序列连同来自基因库中的 4 条相关序列进行了分子系统学分析。结果表明了中华束丝孢和中国被毛孢均是冬虫夏草菌的无性型。

赵锦等^[37]以 rDNA-ITS 区为分子指标,对冬虫夏草的有性和无性阶段进行比较分析,从分子水平证明冬虫夏草的无性阶段是中国被毛孢。

张泽文^[38]采用 PCR 技术,以 rDNA 的 ITS 区为分子指标,对古尼虫草的有性和无性阶段进行比较分析,从分子水平上证明古尼虫草的无性阶段是古尼拟青霉。和冬虫夏草进行了对比,为冬虫夏草的鉴定和遗传多样性提供了证据。

1.1.4.3 简单序列重复区间扩增多态性

简单序列重复区间扩增多态性(Inter-simple sequence repeat ISSR)就是利用生物基因组中常出现的简单序列重复 SSR(simple sequence repeat)设计引物,检测多态性的一种分子标记。是由 Zietkiewicz 等^[39]提出的一种新的分子标记技术。ISSR 是一种类似 RAPD,但利用包含重复序列并在 3'或 5'锚定的单寡聚核苷酸引物对基因组进行 PCR 扩增的标记系统。ISSR 分子标记技术具有操作简单、无须预先知道 DNA 序列、比 RAPD 标记更为灵敏、稳定且实验重复性好等优点,已用于甘蔗、乐昌含笑、怀地黄、华木莲等^[40]的鉴定和遗传多样性的检测分析。

梁洪卉等^[41]利用根据 ISSR 指纹图谱能够鉴定不同产地的冬虫夏草,而且 ISSR 分析表明青海省的冬虫夏草可分成产于环青海湖地区和其他地区两大类,其他地区一大类又可分成青海省南部、中部和东部产区 3 个平行分支。青海省的冬虫夏草在分布上表现出明显的地域性。ISSR 分子标记对于冬虫夏草的鉴定和亲缘关系检测是非常有效的手段。

1.1.4.4 扩增片段长度多态性

扩增片段长度多态性(Amplified Fragment Length Polymorphisms AFLP)是 1992 年由荷兰 Keygene^[42]公司科学家 Zabeau 和 Vos^[43]发明的一种 DNA 分子标记新技术。其基本原理是基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的随机限制性片段,将特定的接头(adapter)连接在这些 DNA 片段的两端,形成一个带接头的特异片段,通过接头序列和 PCR 引物 3'末端的识别后,特异性片段经变性、退火和延伸周期性循环而扩增,最终通过聚丙烯酰胺电泳分子筛作用,将这些特异的限制性片段分离开来。其具有 RFLP 的可靠性,又具有 RAPD 的灵敏性,是分子标记技术重大突破,目前被认为是一种十分理想的、有效的分子标记术^[44]。

不过遗憾的是现在利用 AFLP 技术对冬虫夏草的遗传多样性及其鉴定的研究较少,没有得到什么理想的结果。

1.1.4.5 随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术

随机扩增多态性技术(Random amplified polymorphic DNA RAPD)即随机扩

增多态性 DNA，是 1990 年由 Williams^[30]和 Welsh^[45]领导的两个研究小组几乎同时独立发展起来的。它是建立在 PCR 基础之上，使用一系列具有 10 个碱基的单链随机引物，对整个基因组 DNA 进行 PCR 扩增以检测多态性。由于不同引物扩增出的 DNA 片段不同，因此存在着大量的 RAPD 标记。RAPD 的原理如图 1-1 所示。RAPD 分析和 RFIP 分析相比，具有实验程序比较简便，省时省力，不需要 RFLP 分析的预备性工作。现在 RAPD 技术多用于鉴定及亲缘关系和遗传多样性的研究。

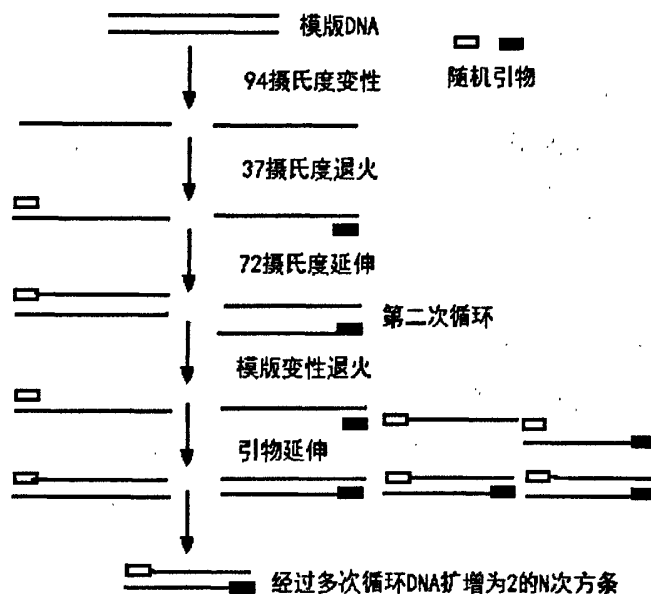


图 1-1 RAPD-PCR 的原理简图

Fig1-1: The principle of RAPD

说明：当 DNA 模板分子在 200-2000 bp 有一小段反向对称的 DNA 序列时，那么通过某一引物与其配对进而合成断链。断链又可做为模板合成另一段新链。其过程是：①加热到 90-94 °C 1min，解开双链；②降温到 37-40 °C 约 1min，引物与模板结合；③加热到 72 °C (约 1min) 引物延长，合成新链。从而完成一个循环。接着进行第二、三……个循环。从而完成 DNA 扩增。

RAPD 技术的特点

(1) RAPD 标记数量多。因为 RAPD 分析所用引物的数量很多，它可以覆盖基因组中所有位点。

(2) 所需模板 DNA 量少，且质量不是很严格，而且 RAPD 分析组织、器官及发育时期的限制。

(3) 所用引物广泛性强，不受物种限制。一套引物可以用于不同生物基因组分析。

(4) RAPD 分析方便、快捷，无需克隆制备、同位素标记、Southern 杂交等复

杂性工作，可以减少对工作人员的危害。

(5)RAPD 是一种基于序列的多态性。可以在没有任何分子生物学基础的情况下对某一物种进行指纹图谱的构建、遗传多样性研究。

(6)RAPD 标记是显性的，因此不能区分一个位点扩增的片段是纯合还是杂合的。

1.1.4.6 RFLP、RAPD、ISSR、AFLP四种分子标记技术的特点对比

随着分子生物学和相关实验技术的不断发展，目前应用于遗传多样性的分子标记技术种类繁多且各具特点，除上述四种以外还有以下相关分子标记技术：可变数目串联序列(Variable Number of Tandem Repeat, VNTR)、DNA扩增指纹分析(DNA Amplification Fingerprinting, DAF)、特定顺序扩增区法(Sequence Characterized Amplified Region, SCAR)、特定序列位点(Sequence-tagged Site, STS)、单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)、酶切扩增多态性序列(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, CAPS)、单链构象多态性(Single-strand Conformation Polymorphism, SSCP)等。下面仅对现今比较常用于冬虫夏草等物种的四种分子标记技术的特点做简单对比，以便于在实际工作中根据所需选择合适的分子标记技术，如表1-1所示^[46-47]

表1-1 四种分子标记技术的特点对比

Table1-1 The character of four molecular markers

比较内容	RFLP	RAPD	ISSR	AFLP
标记分布	普遍	普遍	普遍	普遍
遗传特性	共显性	多数共显性	显性/共显性	多数共显性
多态性水平	高	高	高	非常高
DNA 质量要求	高	低	中	高
检测原理	分子杂交	随机 PCR	随机 PCR	专一 PCR
检测基因组部位	单/低拷贝区	整个基因组	间隔单拷贝区	整个基因组
检测位点数	1-4	1-10	0-50	100-200
探针或引物来源	特定序列	10bp 随机引物	特异引物	特异引物
是否使用同位素	是	否	否	是

1.2 冬虫夏草的研究进展

1.2.1 冬虫夏草的化学成分

冬虫夏草的药作用与它所包含的有效成分是不可分开的。最近几年来，科学

家通过应用各种不同的方法,对冬虫夏草的有效药用成分进行了分析研究,大体上分离出七类物质。

1.2.1.1 虫草多糖

根据药理学及临床研究表明,虫草多糖可以增强人体免疫力,还具有抗肿瘤及降血糖等作用,因此虫草多糖的分离及其研究是现今冬虫夏草生物学研究的一大热点问题。冬虫夏草虫用盐酸水解,NaOH中和,乙醇沉淀蛋白,标准斐林试剂滴定,测得粗糖为23.87%^[48]。白云娥等^[49]用硫酸-萘酚比色法测定了冬虫夏草粗糖中含糖为42%。许周善等^[50]用凝胶过滤法测出冬虫夏草多糖分子量4.3万,单糖组成为甘露糖:半乳糖:葡萄糖=10.3:3.6:1。

1.2.1.2 氨基酸和蛋白质

氨基酸是蛋白质的基础,它可以被人体用于制造抗体蛋白以对抗细菌和病毒的侵染,制造血红蛋白以传送氧气,制造酶和激素以维持和调节新陈代谢;氨基酸是制造精卵细胞的主体物质,是合成神经介质的不可缺少的前提物质,氨基酸能够为机体和大脑活动提供能源,氨基酸是一切生命之元。纪莎等^[51]分析冬虫夏草中含粗蛋白大约为25.32%。李楠^[48]报道冬虫夏草的粗蛋白大约为25.47%,同时含有各种不同的18种氨基酸,其中以谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸、亮氨酸含量最高。

1.2.1.3 脂肪和脂肪酸

脂肪可以储存能量,缓冲外界压力,又是生物体内的物质基础。脂肪酸与维生素,氨基酸一样是人体最重要的营养素之一。根据报道^[49]得出的结论为冬虫夏草的粗脂肪含量为9.18%。其中饱和脂肪酸含量为11.1%-13.6%,不饱和脂肪酸80.2%-82.5%^[52]。

1.2.1.4 糖醇和甾醇类

糖醇和甾醇具有降低胆固醇,治疗脂肪肝,抗炎作用。可以用来生产药品,保健品。日本的松本繁和吉井常人^[53]从冬虫夏草菌丝体中提取到甘露糖醇。20世纪80年代初,我国学者先后从冬虫夏草等中分离到D-甘露醇,草糖,麦角甾醇、麦角甾醇过氧化物,胆甾醇、谷甾醇等,还分离得到D-吡喃葡萄糖苷和2,2-二羟基麦角甾醇,胆甾醇棕榈酸酯,菜油甾醇,二氢菜籽甾醇等^[54]。

1.2.1.5 抗菌活性物质

王伟等^[55]从粤北虫草中分离一株无孢丝状真菌CR-9512,对革兰氏阴性及阳

性细菌,放线菌丝状真菌和酵母菌在内的26株致敏菌株的抗性测定表明,该菌株对放线菌、丝状真菌无拮抗性,对细菌抗性不明显,而对酵母菌则抗性明显。

1.2.1.6 虫草素和生物碱

1951年, Cunningham^[56]在蛹虫草中提纯得到一种晶体,命名为虫草素。虫草素在野生冬虫夏草中的含量极微,现在研究所用的虫草素一般均是从蛹虫草中提取的。有抗病毒、抗肿瘤作用。虫草素作为一种新型的广谱抗菌素,以其特有的抗菌抗病毒活性,已引起全球科技发达国家的高度重视。它能抑制病毒的RNA合成,对枯草杆菌和鸟结核杆菌均有抑制作用,对HIV-I型病毒也有杀伤作用,尤其对多种实体恶性肿瘤有很强的抑制作用。因此,将其作为一种用途广泛的新药来开发是必然的趋势。从冬虫夏草中检出的生物碱有虫草素,尿嘧啶,胸腺嘧啶,腺嘌呤,鸟嘌呤,尿苷,腺苷,次黄嘌呤核苷,次黄嘌呤^[51]。

1.2.1.7 其他成分

主要是一些微量元素。据报道冬虫夏草分离出的微量元素大概有30多种,这些微量元素可能和冬虫夏草的药用机理有一定的作用,起一定的协同作用,这方面有待进一步的分析与研究。

1.2.2 冬虫夏草生物学特性

1.2.2.1 感染

蝙蝠蛾幼虫被冬虫夏草菌感染,其寄生的场所在土壤中,感染寄生的时期为蝙蝠蛾幼虫1年中第2次蜕皮时。在自然条件下冬虫夏草菌是如何感染蝙蝠蛾幼虫的,目前还不十分清楚,推测冬虫夏草菌感染幼虫的途径可能有两条,一条是冬虫夏草菌孢子粘附在植物根部或土坡中,当幼虫采食时,随食物进入体内而感染;另一条是冬虫夏草菌孢子粘附于刚蜕皮或表皮被摩擦损伤的幼虫体上,发芽后形成的芽管穿破体皮而感染^[57]。

1.2.2.2 生长

在高山草甸中,完成一个有性世代需352-379天。冬虫夏草菌侵入虫体后,菌丝体吸取虫体内的蛋白质、脂肪、体液作为自身营养而繁衍,以至菌丝充满整个虫体体腔。染病幼虫钻入土中越冬,约在10月份地温2-9℃时,幼虫死亡成为僵虫,随着地温不断下降,僵化程度越来越高,并形成菌核。从僵化幼虫头部脱裂线“Y”处,开始长出子座。11月至次年2月份,地温极低,子座生长非常缓慢甚至停止生长。4月下旬地温升至5.5℃时,子座恢复生长。5月初,冰雪

融化,土层解冻,子座钻出表土。出土的子座前几天生长最快,10-20天子座呈现棕褐色,顶部开始膨大成圆柱状的子囊座,子囊座内有许多子囊壳,子囊壳内有子囊,每一个子囊含有2-8个线性子囊孢子。25天后子座停止生长,48天后线形子囊孢子成熟。子囊孢子成熟后50天左右子囊孢子开始弹射。弹射孢子后,冬虫夏草失去其商品价值。子囊孢子飘浮在空中或散落地面,可再侵染下一代虫体^[58]。

1.2.2.3 形态

冬虫夏草可分为虫体和菌座两部分,虫体外形较完整,体内充实如僵死的老蚕,表皮呈深黄色至黄棕色,背部有横皱纹,腹部有八对足,以中间四对较明显,头部三对不甚清楚,尾部一对隐约可见。菌座细长,呈圆柱形,直立或稍弯曲,上部膨大,表面深棕色至棕褐色,带有不明显的纵皱纹,质地柔韧,端面内心空虚,呈粉白色^[59]。

1.2.2.4 分布

冬虫夏草主要生长于西藏、青海、四川、甘肃、云南等地,以青藏高原产量最多^[60]。一般分布在海拔3600-5080 m的高山绝顶以及雪线以上,或较为寒冷的北方地区,该地气候特点是气温低、昼夜温差大、无绝对无霜期。常见于光照比较充足、空气和土壤湿润的山地向阳背风的初生林或次生林^[61]。从垂直分布看,分布的下限为3000 m,上限为5100 m,平均高度为4500 m左右。产区的平均气温为0.2-0.8℃,年降水量为556.7-651.3 mm,气候具有明显的干季和雨季^[62]。可以看出影响冬虫夏草分布的生态因素主要有以下几个方面:地形、地貌和海拔高度、气候条件以及土壤。

1.2.3 RAPD 技术在冬虫夏草中的应用

1.2.3.1 构建遗传指纹图谱

遗传图谱又称遗传连锁图谱,是指以染色体重组交换率为相对长度单位,用来描绘基因或遗传标记在染色体上的相对位置,以遗传标记为主体的染色体线状连锁图谱^[63]。遗传连锁图谱是基因组图谱的基础形式,基因组图谱的高级形式是物理图谱,指染色体基因及基因间的DNA序列。经典的遗传图谱是根据形态、生理和生化标记构建的,由于这些遗传标记的数量在作图群体的两亲本上极为有限,所以进展很缓慢,且图谱分辨率、饱和度不高,应用价值有限,分子标记由于数量无限,是构建遗传图谱的主要标记,现今的遗传图谱已成为分子遗传图谱。

于超等^[64]用 RAPD 方法对康定虫草、人工虫草及虫草发酵菌丝体进行指纹

图谱的研究,为不同虫草的品质和药效差异提供分子依据。方法:从 65 个随机引物中筛选出 7 个引物,以这 7 个引物进行 PCR 扩增,电泳得到其指纹图谱。结果表明没有发现任何两个样本拥有完全相同的 RAPD 标记,康定冬虫夏草和人工虫草具有较高的遗传多态性,而与虫草发酵菌丝体相比差异较大。

1.2.3.2 品种鉴别的研究

在不同的地域,由于长期的生活习惯和地方特色,对于同一物种有不同的名称、同一名称而代表不同物种的现象很普遍,给当地生产生活带来许多不便。因此,对易混淆的药材品种进行可靠的鉴别就很有必要。许多药材品种的鉴定通常采取形态学观察、孢粉学、细胞学及同工酶分析的方法,这些方法易受到观测者的主观印象和环境条件的影响,鉴别效率低、误差大,可靠性不强,同时对于一些表型性状较为相似的品种更难以准确区分。RAPD 技术是在基因组水平上进行的遗传标记,取样量较小、不受生态环境、发育阶段、组织或器官种类等因素的影响,且具有丰富的遗传多态性,甚至可以检测到基因组中一些微弱的变化,是品种鉴别的有力工具。品种的亲缘关系的分析是遗传学不可缺少的一个重要组成部分。RAPD 技术能对那些难用直观方法分析的亲缘关系较近,表现型差不多的物种进行研究。主要可以分析鉴定冬虫夏草的无性型。

魏鑫丽等^[36]为了探明冬虫夏草及其相关类群的亲缘关系,以冬虫夏草、中国被毛孢及中华束丝孢(冬虫夏草头孢=蝙蝠蛾多毛孢)共 6 株菌种作为内群和一株蛹草拟青霉作为外群进行了 DNA 随机多态型(RAPD)分析。结果表明,中华束丝孢及中国被毛孢和冬虫夏草同属一个物种。又表明其种内的遗传多样性。

李增智等^[65]从青海的冬虫夏草子实体上分离出中国被毛孢,并利用 RAPD 技术获得了冬虫夏草和中国被毛孢相应的基因组 DNA 指纹图谱,两者相似率高达 96 %,从而表明冬虫夏草的无性型为中国被毛孢。为冬虫夏草的多样性研究及鉴定奠定了基础。

1.2.3.3 遗传多样性和遗传分化研究

随着经济社会的不断发展,对植物种质资源的可持续发展和利用越来越受到重视,保护生物多样性已成为全世界的热点问题,而遗传多样性是生物多样性的核心内容。遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和,但一般所指的遗传多样性是指种内的遗传多样性,即种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和。遗传分化几乎存在于每个物种间,这样的分化有时会表现在外部形态上,有时则难以察觉,随着 RAPD 技术的发展,人们已把该技术应用到种内遗传分化的研究中,对于遗传多样性和遗传分化的研究往往能为植物种质资源的保护给出科学建议。

陈永久^[66]等用 RAPD 标记研究了青藏高原部分地区冬虫夏草的遗传分化,但是没有专门评价青海省冬虫夏草资源的遗传关系。

张云武等^[67]通过 RAPD 方法分析,认为云南西北部的标本之间可能已经达到种级分化的水平,但在随后的报道中认为青藏高原不同地区的冬虫夏草居群应为不同亚种而不是不同的种,丰富了冬虫夏草的多样性研究。

1.3 本实验研究内容

1.3.1 本实验的研究内容主要包括以下几个方面

- 1.通过冬虫夏草的取样,初步了解青海省冬虫夏草生长地的生态环境。
- 2.通过各种不同基因组 DNA 提取方法的对比,选择最好的提取冬虫夏草基因组 DNA 的方法。
- 3.冬虫夏草基因组 DNA 随机扩增多态性技术的优化及其方案的建立。
- 4.根据 RAPD 数据,应用数学及软件技术对冬虫夏草种内及种间遗传多样性,起源及遗传分化进行研究。

1.3.2 拟解决的关键问题

- 1.由于冬虫夏草是虫体和菌体的集合体,对基因组 DNA 的提取方法要进行借鉴和适当的改良。
- 2.RAPD 技术的关键在于扩增引物的筛选和 PCR 反应体系的优化。而反应体系的优化主要是退火温度的确定。
- 3.在数据分析过程中的软件的应用。

第二章 材料与方法

2.1 样品的选取

本实验冬虫夏草材料在 2007 年 7 月—9 月由青海省进出口检疫局分别取自青海省玉树藏族自治州，果洛藏族自治州以及海南藏族自治州 3 个地区的 20 个样品。其中玉树州玉树县，称多县各 4 株，果洛州马沁县，达日县 4 株，海南州兴海县 4 株。

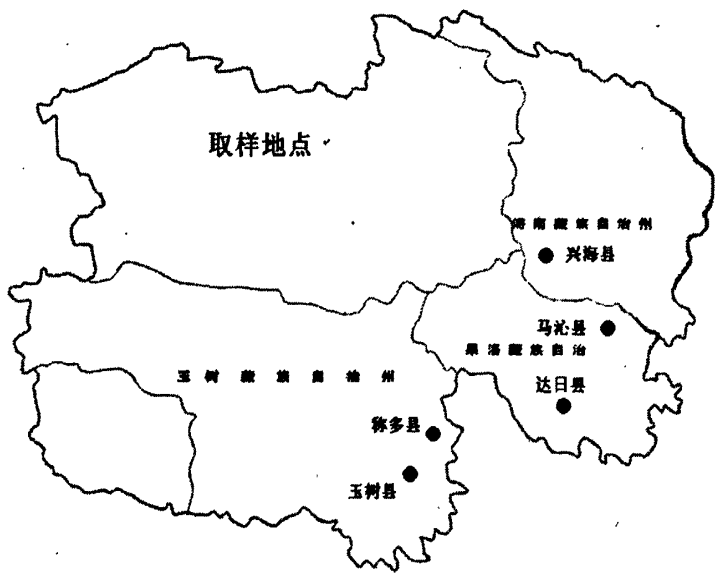


图 2-1 实验材料分布地点示意图

Fig2-1: Experiment material distributed place schematic drawing

表 2-1 实验材料编号

Table2-1: Materials of the experiment

样品产地	样品个数	样品编号
称多县 (CD)	4	1, 2, 3, 4
兴海县 (XH)	4	5, 6, 7, 8
马沁县 (MQ)	4	9, 10, 11, 12
玉树县 (YS)	4	13, 14, 15, 16
达日县 (DR)	4	17, 18, 19, 20

2.2 试剂与仪器

2.2.1 主要试剂

Tris(三羟基氨基甲烷): 上海生工生物工程技术有限公司。

EDTA(乙二胺四乙二钠盐): 上海生工。

CTAB(十六烷基三甲基溴化钠): 上海生工。

SDS (十二烷基硫酸钠): 上海生工。

β -巯基乙醇: 上海生工, 分子式为 C_2H_6OS , 分子量为 78.13。

Taq 酶: 上海生工, 浓度 $5\text{ U}/\mu\text{L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR Buffer (无 Mg^{2+}): 上海生工。

$MgCl_2$: 上海生工, 25 mM , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

dNTPs: 上海生工, 10 mM , $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

随机引物(S 系列 40 个 10 bp 的引物): 上海生工, 储存液浓度 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$, 工作液浓度 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

DNA Marker V(100 bp-3000 bp): 上海生工, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

琼脂糖: 上海生工, 分子式 $C_{19}H_{10}O_5Br_4S$, 分子量 669.97。

电泳缓冲液: 上海生工。

硼酸: 上海生工, 分子式 $B(OH)_3$, 分子量 61.83, 分析纯。

冰醋酸: 上海生工, 分析纯。

氯仿: 上海生工, 分子式 $CHCl_3$, 分子量 119.38, 分析纯。

异戊醇: 上海生工, 分子式 $(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$, 分子量 88.15, 分析纯。

其它试剂: 异丙醇、75 %乙醇、DEPC 水、EB(溴化乙锭)

2.2.2 试剂的配置和准备

CTAB 提取液: 2% CTAB, 100 mmol/L , 20 mmol/L EDTA($\text{pH}=8.0$), 1.5 mol/L NaCl, 去离子水。Tris-HCL ($\text{pH}=8.0$), 用前加 2% β -巯基乙醇。

SDS 提取液: 100 mmol/L Tris-Cl($\text{pH}=8.0$), 50 mmol/L EDTA ($\text{pH}=8.0$), 500 mmol/L NaCl。

TE 缓冲液 (100 ml): 1 ml 1 mol/L Tris-HCl($\text{pH}8.0$), 0.2 ml 0.5 mol/L EDTA ($\text{pH}8.0$), 98.8 ml 去离子水。

0.1% DEPC 水: 0.1 ml DEPC 加入 100 ml 双蒸水中, 振摇过夜, 再湿热灭菌。

Tris 平衡酚 (Saturated phenol), ($\text{pH}7.9\pm0.2$)。

3 mol/L 乙酸钠 (NaAc, $\text{pH}=5.2$ 和 $\text{pH}=7.0$): 在 800 ml 水中溶解 408.1 ml 三水乙酸钠, 用冰乙酸调节 pH 值至 5.2 或用稀乙酸调节 pH 至 7.0, 加水定容

到 1 L, 分装后高压灭菌。

50×TAE 电泳缓冲液 (1000 ml): 242 g Tris, 57.1 ml 冰乙酸, 37.2 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$, 补水至 1000 ml。

1×TBE 电泳缓冲液 (50 ml): Tris 54 g, 硼酸 27.5 g, EDTA 3.72 g 加水定容至 50 ml。

2.2.3 主要仪器

电泳仪: DYY-6C 型, 北京六一仪器厂

水平电泳槽: 0231-D, 北京六一仪器厂

恒温振荡箱: THZ-98AB, 上海恒一科技有限公司

PCR 基因扩增仪: PTC-100, 美国

凝胶成相系统: 北京新技术应用研究所

可调温高速离心机: Eppendorf Gentrifuge-S804, 美国

双人单面净化工作台: SW-CT-SFD, 苏州净化设备有限公司

紫外分光光度计: UV-9100, 上海天美科学仪器有限公司

紫外穿透反射仪: WFH-201B, 上海精科实验有限公司

其他仪器与耗材: 电冰箱, 水浴锅, 电子天平, 灭菌锅, 移液枪, 离心管。

2.3 实验方法

2.3.1 冬虫夏草基因组 DNA 的提取, 纯化以及检验

对于分子实验的冬虫夏草标本, 直接自然干燥后, 放在 $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用或放在干燥无虫害危害的地方保存。去除外源 DNA 污染, 如细菌、真菌等。取出干燥样品, 用去离子水清洗后, 用纯水清洗, 再用 75 % 乙醇浸洗, 晾干。提取前用蒸馏水洗净, 轻轻刮去虫草表皮。选取受测部位适量, 切成小块, 待提取。

2.3.1.1 基因组 DNA 提取

提取高质量的 DNA 是进行基因组研究的基础, 也是进行分子生物学和分子遗传学研究的根本前提。目前, 国内外学者提出了很多种 DNA 提取方法, 这些方法因研究对象和目的的不同而异。本实验选用 SDS 提取法^[68]和改良的 CTAB 法^[41,69]对虫草基因组 DNA 进行的提取的比较。

(1) SDS 法提取步骤

- 1.取适量样品, 约 0.05 g-0.1 g, 用液氮反复研磨成粉末, 将粉末置于 1.5ml 离心管中。
- 2.加入 400 μ l 的 65 $^{\circ}$ C 预热的 SDS 提取缓冲液。
- 3.充分混匀后在 65 $^{\circ}$ C 水浴 1-2 h, 其间混摇数次。
- 4.冷却后加入 1/3 体积的 5 M KAC, 置冰箱 10 min。
- 5.取出在 4 $^{\circ}$ C 下 10000 r/min 离心 10 min。
- 6.取上清液移至另一离心管中, 加入等体积的氯仿-异戊醇, 混匀后轻轻颠倒离心管数次, 放置片刻。
- 7.4 $^{\circ}$ C 下 10000 r/min 离心 10 min。
- 8.取上清液移至另一离心管中, 加入等体积预冷异丙醇, 混匀, 10000 r/min 离心 10 min。
- 9.倒去上清液, 用 70 % 的乙醇轻轻洗沉淀 2-3 次, 然后在室温下干燥。
- 10.加入 50 μ l TE 溶液溶解沉淀备用。

(2) CTAB 法提取步骤

- 1.称取适量样品, 用液氮磨反复成粉末, 将粉末置于 1.5 ml 离心管中。
- 2.加 700-800 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取液, 65 $^{\circ}$ C 保温 4-5 h. 其间混摇数次。
- 3.加入 1 % 的 3 M 乙酸钠, 混匀。
- 4.10000 r/min 离心 10 min, 移上清至新管中。
- 5.加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 抽提, 颠倒使混匀, 10000 r/min 离心 10 min, 移上清至新管中。
- 6.反复步骤 5 抽提 2-3 次。直到看不清中间层为止。
- 7.吸取上清液加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 在 -20 $^{\circ}$ C 静置 2 h 沉淀 DNA。
- 8.7500 g 离心 10 min。用牙签挑出白色絮状沉淀放入新管, 加入 75 % 乙醇洗涤 2 次。
- 9.自然干燥后将沉淀的 DNA 用 50 μ l DEPC 水溶解。
- 10.4 $^{\circ}$ C 下过夜使 DNA 溶解充分。置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 要长期保存需储存与 -75 $^{\circ}$ C 冰箱中。

2.3.1.2 DNA 模板纯度和浓度的测定

(1) 琼脂糖电泳法^[70]。

- 1.称取 0.5 g 琼脂糖, 放入 100 ml 锥形瓶中, 按凝胶浓度为 1 % 加入 1 $\times$ TAE

50 ml, 在微波炉中加热至沸腾气泡变大, 反复多次使溶解充分, 即琼脂糖完全溶解。

2. 冷却至 50 ℃ 左右, 加入终浓度为 0.5 μg/ml 的 EB (强致癌), 混合均匀并排净气泡。

3. 将凝胶床水平放置, 插入梳子, 注意梳齿高于底板 0.5-1.0 mm。

4. 等到琼脂糖凝胶溶液不再挥发后, 将凝胶溶液倒入准备好的凝胶床, 其厚度为 3-5 mm, 室温放置 30-60 min, 使胶完全硬化。

5. 小心拔出梳子, 检查样品孔是否完整。

6. 加样, 取 3-4 μl DNA 样品, 与加样缓冲液混合至 5 μl。

7. 用移液器将样品加入样品孔内。操作时, 可用右手持移液器, 左手握住右手腕, 右手肘支撑桌面, 防止点样时右手晃动。

8. 同样操作加入 2 μl DNA 标准分子量标记。

9. 电泳, 盖上电泳槽盖, 接通电源, 在电压 100 V 下电泳 1-2 小时。

10. 当染料通过凝胶全长的 80 % 时停止电泳, 放在紫外灯下观察、照相。

观察点样孔及整个泳道, 估计样品中蛋白质、RNA 及其它杂质质量的多少, 以此判断 DNA 样品的纯度。纯的 DNA 样品在紫外线 (245 nm) 下应呈现一条迁移率很小的整齐条带。如果有弥散的荧光区出现, 则表明样品中存在 RNA 杂质。若 DNA 在凝胶上不形成清晰的条带, 而只是弥散的一片, 则表明 DNA 已严重降解。

DNA 样品量: 比较被测 DNA 样品条带与标准 DNA 样品条带的荧光强度, DNA 量相同时所产生的荧光强度相同。

DNA 分子质量标准物各条带的 DNA 量 = 标准物浓度 (μg/ml) × 加样体积 × 条带 bp 数 / 标准物总 bp 数。

胶里面痕量的 EB 没有问题, 如果小于 0.1 % 可以直接扔掉。而如果发红, 即大于等于 0.1 % 时应该放在生物危害柜中焚烧掉。

(2) 紫外分光光度法

1. 预热紫外分光光度计 10-20 min。

2. 对紫外分光光度计进行调零。

3. 在准备好的比色杯中加入 DNA 样品 10 μl, 用 DEPC 水补满至 400 μl。

4. 混匀后放入紫外分光光度计中测量, 另一支比色杯中加入纯净的 DEPC 水做参照进行对比, 记录 DNA 样品在波长为 260, 280 nm 下的光吸收值。

5. 根据公式计算 DNA 的浓度

$$\text{DNA 浓度 (ng/μl)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{样品稀释倍数}$$

6.DNA 纯度的计算

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

纯的 DNA 样品 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 应在 1.6-1.9 之间，如 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 大于 1.9 时，表明有 RNA 污染，小于 1.6 则表明有蛋白质或其他酚类物质的污染。

2.3.2 RAPD-PCR 体系优化

RAPD 反应受各种因素的影响，使其结果不可预测，变化较大。但是通过科学的方法对反应的体系及程序进行优化是可以得到比较好的结果，满足遗传学的数据统计要求。

2.3.2.1 正交优化设计

参考文献^[36]暂时确定本实验的基本 PCR 扩增反应的体系为 20 μl ，其中包括 Taq 酶(浓度为 5 U/ μl)，10 $\times$ PCR 缓冲液(无 Mg^{2+})，25 mM Mg^{2+} ，10 mM dNTPs，随机引物 Primer(10 $\mu\text{mol/L}$)，DNA 模板 20-35 ng，ddH₂O。为了确定以上 5 个因素最佳反应浓度，以玉树县的 DNA 样品 13 为模版，S₁₇₄ 作为引物进行了正交设计。

表 2-2 RAPD 反应体系中的因素水平表

Table 2-2: The levers of factors

因 素		水 平			
		1	2	3	4
A	模板 DNA 浓度 (ng)	20	25	30	35
B	Taq 酶浓度(U)	0.8	1.0	1.5	2.0
C	引物浓度($\mu\text{mol/L}$)	0.4	0.6	0.8	1.0
D	dNTPs 浓度 (mmol/L)	0.10	0.15	0.20	0.25
E	Mg^{2+} 浓度 (mmol/L)	1.0	1.5	2.0	2.5

按表 2-3 实验方案进行 PCR 扩增。

2.3.2.2 单因子因素-退火温度的试验

RAPD-PCR 所用的扩增程序包括：变性、复性和扩增的温度、时间以及循环的次数。理论上扩增能够无限制地长期进行，但实际上受各种因素的限制。扩增的温度和时间包括变性温度和时间、退火温度和时间及延伸温度和时间，还包括循环次数的影响^[37]。其中退火的温度和循环的次数是扩增结果好坏的重要因素。

表 2-3 正交实验方案表 L₁₆ (4⁵)
Table 2-3: The Scheme of orthogonal experiment

试验编号	列 号				
	A	B	C	D	E
	1	2	3	4	5
1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4
5	2	3	2	3	4
6	2	4	1	4	3
7	2	1	4	1	2
8	2	2	3	2	1
9	3	4	3	4	2
10	3	3	4	3	1
11	3	2	1	2	4
12	3	1	2	1	3
13	4	2	4	2	3
14	4	1	3	1	4
15	4	4	2	4	1
16	4	3	1	3	2

退火是引物与模板 DNA 单链相结合配对的过程，它是按照碱基互补配对原则进行的。退火温度的选择与引物的长度、C+G 的含量有关。在 RAPD 分析中，一般采用的退火温度为 35-40 ℃，时间 30-90 S。因此退火温度是关键点。在确定最佳退火温度时，优化过程在前面优化结果的基础上按单因子梯度进行，其他因素与基本反应条件相同。本实验以玉树县的 DNA 样品为模版，S₁₇₄ 作为引物设置了 7 个退火温度：36 ℃，37 ℃，38 ℃，39 ℃，40 ℃，41 ℃，42 ℃。

2.3.2.3 单因子因素-循环次数的试验

当循环次数少时，扩增产物的量对于数据分析太少，当循环次数过多时，扩增的量不再增加，达到饱和状态。通常扩增在 30-45 个循环。本实验以玉树县的 DNA 样品为模版，S₁₇₄ 作为引物设置了 4 个循环次数：36 次，38 次，40 次，42 次。

2.3.2.4 引物的筛选

利用 20 个样品的 DNA 模版在所购买的在 2 套 40 条 S 系列的随机引物中进行筛选，选出重复性好，扩增条带数多，多态性强的引物。

表 2-4 实验用到的 S 系列引物编号及序列

Table 2-4: Primers' sequence and Number

编号	序列 5'-3'	编号	序列 5'-3'	编号	序列 5'-3'
S ₃	CATCCCCCTG	S ₆₁	TTCGAGCCAG	S ₄₄₄	AAGTCCGCTC
S ₄	GGACTGGAGT	S ₆₇	GTCCCGACGA	S ₄₄₈	CCTCCAGTGT
S ₇	GGTGACGCAG	S ₇₂	TGTCATCCCC	S ₄₆₀	ACACACGCTG
S ₁₀	CTGCTGGGAC	S ₈₃	GAGCCCTCCA	S ₄₈₃	GGTCACCTCA
S ₁₁	GTAGACCCGT	S ₁₅₇	GTA CTGCCGT	S ₁₁₁₉	CCAGGTCTTC
S ₁₅	GGAGGGTGTT	S ₁₇₄	TGACGGCGGT	S ₂₀₀₁	TTCCCCACCC
S ₁₈	CCACAGCAGT	S ₂₄₆	ACCTTTGCGG	S ₂₀₀₃	GTGCGAGAAC
S ₂₃	AGTCAGCCAC	S ₂₇₄	CTGCTGAGCA	S ₂₀₀₈	CCACAGCCGA
S ₂₄	AATCGGGCTG	S ₂₇₈	TTCAGGGCAC	S ₂₀₀₉	GGA ACTCCAC
S ₂₈	GTGACGTAGG	S ₂₉₀	CAAACGTGGG	S ₂₀₁₀	GGACGTTGAG
S ₃₃	GAGACCCAC	S ₃₂₀	CCCAGCTAGA	S ₂₀₄₀	CCAGGTGTAG
S ₄₄	TCTGGTGAGG	S ₃₂₄	AGGCTGTGCT	S ₂₀₄₁	CCTTCGGCTC
S ₄₅	TGAGCGGACA	S ₄₃₅	CAGCGACTGT		
S ₅₅	CATCCGTGCT	S ₄₄₁	GGCACGTAAG		

2.3.3 进行 RAPD-PCR 扩增

利用优化确定的反应体系和条件在 PCR 基因扩增仪上对几个产地的冬虫夏草样品进行 PCR 扩增。

2.3.4 RAPD 扩增产物观察

将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测（方法同 2.3.1.2），电泳结束后，将加有 EB 的胶板置于凝胶成像系统中观察拍照，DNA 存在的区域会显示出肉眼可辨的橘红色荧光条带。

2.4 数据的统计与分析方法

2.4.1 数据的统计

利用软件 BandScan 对电泳扩增图谱进行识谱分析。电泳扩增图谱中的每一条带（DNA 片段）均为一个分子标记，并代表一个引物结合位点，可以把它看作是一个遗传位点。根据各分子标记在相同电泳迁移率下（相同分子量片段）

的有无统计得到所有位点的二元数据, 把 RAPD 分析结果转换为数字形式, 有 DNA 扩增带(显性)为 1, 无带记 0, 强带和可分辨的弱带均赋值为 1。以 1、0 矩阵的形式输入计算机。

2.4.2 统计数据的分析

利用公式和软件分析多态性百分率, 遗传系数, 遗传距离。最后利用美国应用生物统计公司(Applied Biostatistics Inc.)开发的 NTSYSpc 2.10e 软件运用 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean 非加权配对算术平均法) 法构建亲缘关系聚类分析树状图。

2.4.2.1 遗传数据计算方法

(1) 多态性百分率 $P = (\text{多态性谱带数} / \text{总谱带数}) \times 100\%$

多态性谱带数 = 总谱带数 - 共有谱带数

(2) 相似系数 $F = (2\chi_{1.2} / \chi_1 + \chi_2)^{[42]}$

其中 F 表示相似性系数, $\chi_{1.2}$ 表示品种 1 和品种 2 共同具有的分子量相同的 DNA 谱带; χ_1 为品种 1 的 DNA 扩增带数, χ_2 为品种 2 的 DNA 扩增带数。F 值越大, 表示其亲缘关系越近; F 值越小, 表示其亲缘关系越远。

(3) 遗传距离 $D = 1 - F$ (相似系数)

2.4.2.2 聚类软件使用方法

(1) 输入数据生成矩阵: 在 excel 中输入数据, A1 表示有带记为 1, B1 表示扩增的总条带数, C1 表示样本数, D1 表示无带记为 0。第二行表示的是样本名称。从第三行开始的 A 列表示引物名称。输入完毕后, 将文件保存。

(2) 计算相似性系数: 打开该软件的主程序(NTSYSpc), 点击相似性(Similarity)一栏的定性数据(Qualitative data), 在输入文件(Input file)一栏中双击插入刚才保存的原始数据文件; 计算系数(Coefficient)可选 Dice 或 Jaccard, 结果差不多; 在输出文件(Output file)中输入要保存文件(相似性系数文件)的路径和文件名或双击后选择存储路径和输入文件名; 然后点击计算(Compute), 相似性系数便算出来了。

(3) 聚类分析: 点击聚类(Clustering)中的成聚计算(SAHN), 在输入文件(Input file)一栏中双击插入相似性系数文件, 在输出树形文件(Output tree file)中输入要

保存文件(树形聚类文件)的路径和文件名或双击后选择存贮路径和输入文件名;在聚类方法(Clustering method)一栏通常选用使用算术平均的不加权对群法(UPGMA),其余用默认值即可;最后点击计算(Compute),树形聚类文件便算出来了。

(4)显示聚类结果(树形图):点击图示(Graphics)中的树形图(Tree plot),在输入文件(Input file)一栏中双击插入树形聚类文件,点击计算(Compute),树状图便显示出来了。

第三章 实验结果与分析

3.1 冬虫夏草基因组 DNA 提取方法的比较与分析

3.1.1 电泳检测

本实验运用了 2 种方法提取冬虫夏草基因组 DNA，分别采用了 SDS 法和经过改良的 CTAB 法。将提取的基因组 DNA 在琼脂糖凝胶上进行电泳，得到结果图 通过图 3-1 可以看出，采用 SDS 法提取的 DNA，电泳条带不清楚，而且降解的现象比较严重，说明提取产物中可能含有一些杂质，影响了 DNA 的电泳速率。相比之下，运用改良的 CTAB 法提取的 DNA 条带清晰，降解的程度比较低。

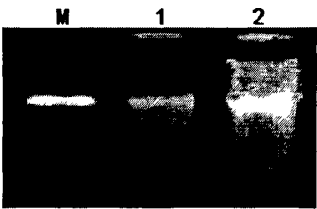


图 3-1 2 种方法提取方法的电泳检测结果

Fig3-1: Genomic DNA electrophoresis of 2 methods in *Cordyceps sinensis*

M: DNA Marker, 1: SDS 法, 2: 改良 CTAB 法

3.1.2 紫外分光光度法的检测

将 SDS 法和改良 CTAB 法提取的 DNA 样品分别经紫外分光光度计进行检测其浓度，得到的结果如表。从表 3-1 中数据可以看出用 SDS 法提取的 DNA 样品 OD_{260}/OD_{280} 的值偏低，说明含有的蛋白质和多糖的含量较多。而采用改良 CTAB 法提取的 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值相对较高， OD_{260}/OD_{280} 值间于 1.6-2.0 之间，说明 DNA 质量较好。因此，通过以上 2 种方法的对比可以看出，改良的 CTAB 比较适合冬虫夏草 DNA 基因组的提取。

表 3-1 2 种方法提取冬虫夏草基因组 DNA 紫外分光检测结果

Table 3-1: The genomic DNA ultraviolet result of 2 methods in *Cordyceps sinensis*

方 法	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 浓度 (ng/μl)
SDS 法	0.132	0.100	1.32	264
改良 CTAB 法	0.163	0.098	1.67	326

3.2 DNA 浓度和纯度的检测

3.2.1 琼脂糖凝胶电泳检测

用改良的 CTAB 法提取的冬虫夏草基因组 DNA 在琼脂糖凝胶电泳检测的结果见图 3-2, 通过图片可以看出胶块上呈现出明亮并且整齐迁移的条带, 说明 DNA 的提取没有造成模版的降解, 微量的 RNA 杂质不足以影响实验。点样孔附近出现的亮处说明样品中残留有少量的蛋白质和酚类物质。

3.2.2 紫外分光光度法的检测结果

表 3-2 紫外分光光度法检测 DNA 纯度与浓度结果
Table 3-2: Results of analysis of DNAs by UV/vis spectrophotometer

DNA 模版	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	DNA 浓度 (ng/μl)
1	0.254	0.155	1.63	508
2	0.157	0.099	1.58	314
3	0.092	0.061	1.52	184
4	0.146	0.091	1.61	292
5	0.125	0.079	1.57	250
6	0.102	0.069	1.48	204
7	0.234	0.142	1.65	468
8	0.147	0.085	1.72	294
9	0.241	0.144	1.67	482
10	0.195	0.126	1.55	390
11	0.413	0.263	1.57	826
12	0.236	0.158	1.49	472
13	0.295	0.173	1.71	590
14	0.306	0.184	1.66	612
15	0.174	0.112	1.56	348
16	0.143	0.101	1.42	286
17	0.232	0.149	1.56	464
18	0.386	0.251	1.54	772
19	0.245	0.152	1.61	490
20	0.197	0.125	1.57	394

紫外分光光度法比琼脂糖凝胶电泳法精确, 从表 3-2 可以得到, 被测的模版 DNA 的平均浓度为 432 ng/μl, 样品 DNA 提取的产率不算太高, 可能是由于冬虫夏草为干燥样品有关。为了使模版 DNA 的浓度保持在 20-35 ng 之间好

进行 PCR 扩增，将提取的模版 DNA 分别稀释 10 倍备用。

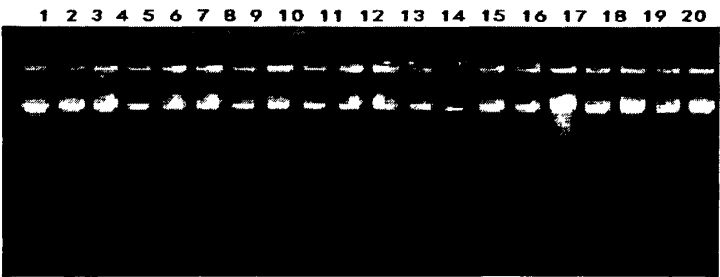


图 3-2 模版 DNA 的电泳检测结果

Fig3-2: The results of DNA by agarose gel electrophoresis
1—20:提取的 20 个样品基因组 DNA 编号

OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值在 1.6-1.8 之间，说明所提取模板 DNA 没有 RNA 污染，但比值小于 1.6 的样品有大分子物质如蛋白质或多糖类的污染，这与琼脂糖凝胶电泳法的结果一致。但这一范围不影响后面的 RAPD 扩增反应。

3.3 最佳 PCR 扩增反应体系的建立

3.3.1 正交试验的结果分析

将正交试验方案扩增的结果通过琼脂糖凝胶电泳检测，得到电泳图 3-3。

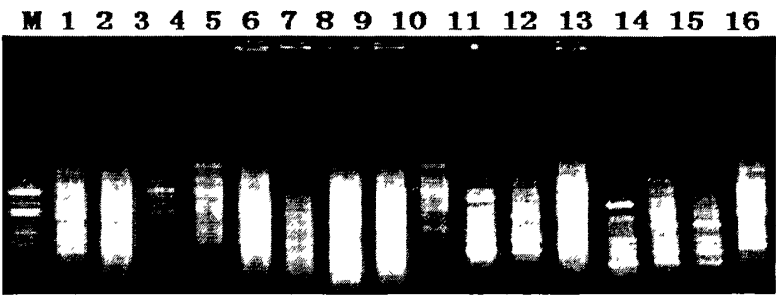


图 3-3 正交试验电泳检测结果

Fig3-3: The results of the orthogonal experiment
M: DNA Marker; 1—16: 16 次正交试验编号

根据电泳检测出的条带数，进行正交试验结果的统计与计算，得到表 3-3。正交结果中 R 值的大小可以反映出该因素对结果影响的大小，表 3-3 可以看出在进行试验的 5 个因素中 Taq 酶浓度是影响最大的因素，其次按影响大小依次为 dNTPs 浓度，Mg²⁺浓度，模板 DNA 浓度和引物浓度。从扩增条带数的多少，清晰程度，重复性可以得出最后一组的组合扩增出了最多的条带数，为 12 条，

并且条带数较之最为清晰。这组组合为 $A_4B_4C_1D_3E_2$ 。但是按正交试验的原理，最佳组合应该是列表中个 $\bar{x}$ 值的最大值组合，即应该为 $A_2B_4C_2D_1E_2$ 。但是这组最佳组合并不在正交方案表中，因此将这两组进行扩增并且比较，图 3-4 呈现出比较结果。

表 3-3 正交结果统计表

Table 3-3: The result of orthogonal experiment

因素 试验号	A 模板 DNA 浓度	B Taq 酶浓度	C 引物浓度	D dNTPs 浓度	E Mg ²⁺ 浓度	条带数
	1	2	3	4	5	
1	1	1	1	1	1	8
2	1	2	2	2	2	10
3	1	3	3	3	3	5
4	1	4	4	4	4	7
5	2	1	2	3	4	9
6	2	2	1	4	3	7
7	2	3	4	1	2	11
8	2	4	3	2	1	12
9	3	1	3	4	2	6
10	3	2	4	3	1	7
11	3	3	1	2	4	7
12	3	4	2	1	3	11
13	4	1	4	2	3	6
14	4	2	3	1	4	8
15	4	3	2	4	1	7
16	4	4	1	3	2	12
T ₁	30	29	34	38	34	
T ₂	39	32	37	35	39	
T ₃	31	30	31	33	29	
T ₄	33	42	31	27	31	
$\bar{X}_1$	3.75	3.63	4.25	4.75	4.25	
$\bar{X}_2$	4.88	4.00	4.63	4.38	4.88	
$\bar{X}_3$	3.88	3.75	3.88	4.13	3.63	
$\bar{X}_4$	4.13	5.25	3.88	3.38	3.88	
R	1.13	1.62	0.75	1.37	1.25	

T 为同一水平下各因素之和， $\bar{x}$ 为同一水平下各因素的平均值，R 为各因素的 $\bar{x}$ 中最大值减去最小值的极差。

从图 3-4 中看出 1 组合扩增的条带数比较清晰，重复性较好，比 2 组合多扩增出一条谱带。最终确定组合 $A_2B_4C_2D_1E_2$ 为最佳扩增体系。



图 3-4 最佳组合比较

Fig3-4: Selecting optimum combinations of amplification condition

1: A₂B₄C₂D₁E₂, 2: A₄B₄C₁D₃E₂

3.3.2 退火温度的筛选结果

按确定的最佳反应体系为基础，以玉树县的 DNA 样品 13 为模版，S₁₇₄ 作为引物进行的单因素梯度扩增的结果如图 3-5。

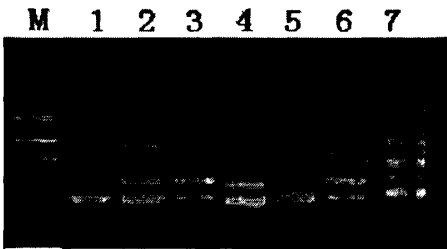


图 3-5 退火温度梯度扩增结果

Fig3-5: The results with different annealing temperature of Amplification

M: DNA Marker; 1---7: 退火温度 36℃—42℃

从图 3-5 中可以看出退火温度控制在 2—3 两个温度时可以扩增出清晰的条带，并且条带数目较多。2 和 3 进行比较，2 得到的条带更清晰，因此本实验选择 37℃ 为 RAPD 的退火温度。

3.3.3 循环次数的筛选结果

按确定的最佳反应体系为基础，以玉树县的 DNA 样品 13 为模版，S₁₇₄ 作为引物，为退火温度进行的单因素梯度扩增的结果见图 3-6。

四个梯度扩增循环数的电泳结果表明 36，38 和 42 次循环次数扩增效果不太好，循环数过少，不能获得足够的扩增产物。循环数过多，得到的谱带数反而有所减少，如图 3-6。因此本实验确定循环数为 40 次。

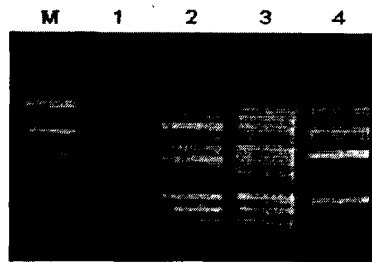


图 3-6 循环次数梯度扩增结果

Fig3-6: The results with different cycle times of Amplification

M: DNA Marker; 1—4: 循环次数 36 次—42 次

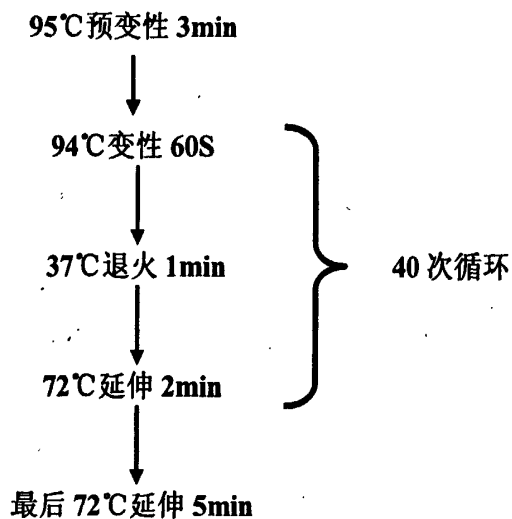
3.3.4 最终 PCR 扩增体系

表 3-4 最佳 PCR 反应体系

Table 3-4: PCR reaction system

成分	浓度	体 积
模板 DNA	35ng	0.5 μ l -2 μ l
Taq 酶	2.0U	0.4 μ l
引 物	0.4 μ mol/L	0.8 μ l
dNTPs	0.2mmol/L	0.4 μ l
Mg ²⁺	1.5mmol/L	1.2 μ l
Buffer(无 Mg ²⁺)	10 $\times$ PCR	2.0 μ l
ddH ₂ O		13.2 μ l-14.7 μ l
体系总体积		20 μ l

3.3.5 最终 PCR 反应程序



3. 4 RAPD 扩增结果与分析

3. 4. 1 引物的筛选结果

以优化好的反应体系为基础，从 40 条随机引物中筛选出 9 条，这些引物能在 20 份冬虫夏草样品基因组 DNA 上扩增出较清晰、稳定的多态性条带。引物序列与扩增结果统计见表 3-5。

由表 3-5 可以看出筛选出的 9 条引物对不同产地冬虫夏草 20 个 DNA 样品进行 PCR 扩增，共检测到 65 个位点，平均每条引物检测到 7.2 个位点，其中呈多态性位点 57 个，平均多态性条带数为 6.3 条，多态性位点比率 P 为 87.69 %，9 个引物的多态位点比率从 75 %--100 %不等。单个引物扩增的多态性带不同，最多为 10 条，最少有 5 条。

表 3-5 冬虫夏草引物序列与扩增谱带
Table 3-5: Primers' sequence and amplification efficiency in *Cordyceps sinensis*

引物编号	序列 5'-3'	扩增条带数	多态性条带数	多态性 (%)
S ₄	GGACTGGAGT	5	5	100
S ₇	GGTGACGCAG	9	8	88.9
S ₁₁	GTAGACCCGT	8	6	75
S ₂₃	AGTCAGCCAC	7	7	100
S ₃₃	GAGCACCCAC	8	6	75
S ₁₇₄	TGACGGCGGT	10	9	90
S ₃₂₄	AGGCTGTGCT	6	5	83.3
S ₄₈₃	GGTCACCTCA	7	6	85.7
S ₂₀₀₈	CCACAGCCGA	5	5	100
总数		65	57	
平均		7.2	6.3	88.65

统计结果表明 9 条引物在不同产地冬虫夏草样品中扩增的条带数分别为 5，9，8，7，8，10，6，7，5 条，其中的多态性条带数为 5，8，6，7，6，9，5，6，5 条。多态性位点比率为 100 %，88.9 %，75 %，100 %，90 %，83.3 %，85.7 %，100 %。各引物的平均多态性位点比率为 88.65 %。

3. 4. 2 部分 RAPD 结果统计 0，1 矩阵和引物扩增图谱

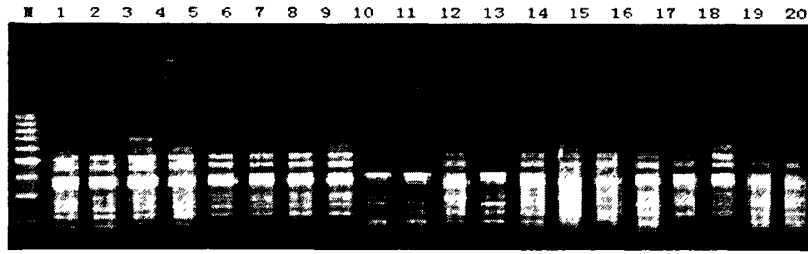


图 3-7 引物 S_{174} 扩增图谱

Fig3-7: The results of Amplification with primer S_{174}

M: DNA Marker; 1--20: 冬虫夏草样品编号

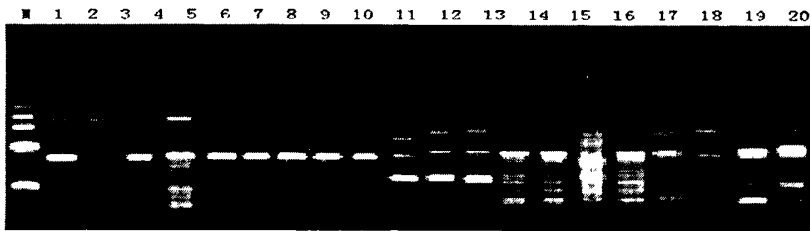


图 3-8 引物 S_7 扩增图谱

Fig3-8: The results of Amplification with primer S_7

M: DNA Marker; 1--20: 冬虫夏草样品编号

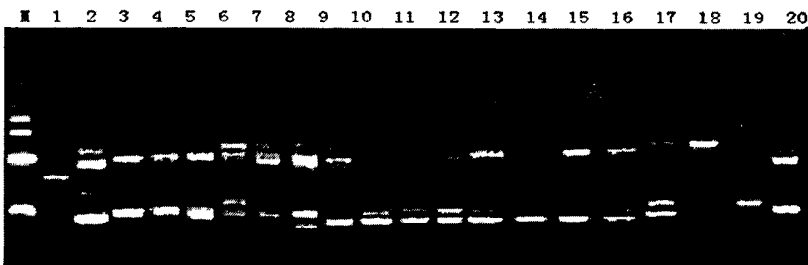


图 3-9 引物 S_4 扩增图谱

Fig3-9: The results of Amplification with primer S_4

M: DNA Marker; 1--20: 冬虫夏草样品编号

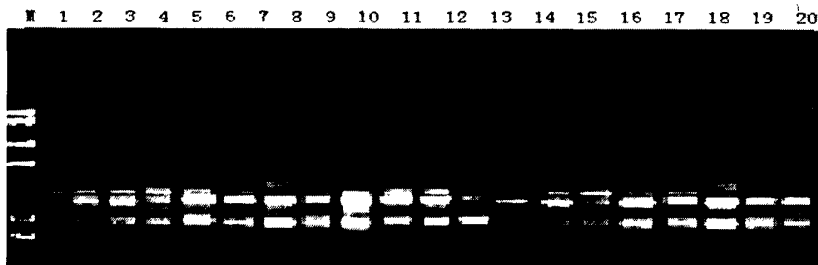


图 3-10 引物 S_{23} 扩增图谱

Fig3-10: The results of Amplification with primer S_{23}

M: DNA Marker; 1--20: 冬虫夏草样品编号

表 3-6 引物 S₁₇₄ 扩增产物的 0, 1 数据矩阵表
Table 3-6: The 0,1 matrix of Amplified products with primer S₁₇₄

样品 条带																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
D2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
D3	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
D4	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
D5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
D6	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
D7	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0
D8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
D9	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
D10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

3.5 相似系数，遗传距离和聚类分析

表 3-7 20 个冬虫草样品的遗传相似系数表
Table 3-7: General similarity matrix of 20 samples of *Cordyceps sinensis*

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1.0000																			
2	.7273	1.0000																		
3	.8333	.9091	1.0000																	
4	.8333	.9091	.8333	1.0000																
5	.5000	.5455	.6667	.5000	1.0000															
6	.5455	.4000	.5455	.3636	.7273	1.0000														
7	.3636	.2000	.3636	.1818	.7273	.8000	1.0000													
8	.5000	.3636	.5000	.3333	.8333	.7273	.9091	1.0000												
9	.5455	.6000	.7273	.5455	.7273	.6000	.6000	.5455	1.0000											
10	.5455	.4000	.5455	.5455	.7273	.6000	.6000	.5455	.8000	1.0000										
11	.3636	.4000	.5455	.3636	.9091	.8000	.8000	.7273	.8000	.8000	1.0000									
12	.4000	.4444	.6000	.4000	.8000	.6667	.6667	.6000	.8889	.8889	.8889	1.0000								
13	.6667	.9091	.8333	.8333	.5000	.3636	.3636	.5000	.5455	.3636	.3636	.4000	1.0000							
14	.7273	.6000	.5455	.7273	.1818	.4000	.4000	.3636	.4000	.4000	.2000	.2222	.7273	1.0000						
15	.5455	.6000	.5455	.5455	.3636	.6000	.6000	.5455	.4000	.2000	.4000	.2222	.7273	.8000	1.0000					
16	.4000	.4444	.4000	.4000	.4000	.6667	.6667	.6000	.2222	.2222	.4444	.2500	.6000	.6667	.8889	1.0000				
17	.5455	.6000	.7273	.5455	.9091	.6000	.6000	.7273	.6000	.6000	.8000	.6667	.5455	.2000	.4000	.4444	1.0000			
18	.5455	.4000	.5455	.3636	.7273	.6000	.8000	.9091	.4000	.4000	.6000	.4444	.5455	.4000	.6000	.6667	.8000	1.0000		
19	.7273	.6000	.7273	.5455	.7273	.8000	.6000	.7273	.4000	.4000	.6000	.4444	.5455	.4000	.6000	.6667	.8000	.8000	1.0000	
20	.5455	.4000	.5455	.3636	.7273	.6000	.8000	.9091	.4000	.4000	.6000	.4444	.5455	.4000	.6000	.6667	.8000	.9876	.8000	1.0000

表 3-8 20 个冬虫夏草样品的遗传距离
Table 3-8: Genetic distance index of 20 samples of *Cordyceps sinensis*

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1.0000																			
2	.2727	1.0000																		
3	.1667	.0909	1.0000																	
4	.1667	.0909	.1667	1.0000																
5	.5000	.4545	.3333	.5000	1.0000															
6	.4545	.6000	.4545	.6364	.2727	1.0000														
7	.6364	.8000	.6364	.8182	.2727	.2000	1.0000													
8	.5000	.6364	.5000	.6667	.1667	.2727	.0909	1.0000												
9	.4545	.4000	.2727	.4545	.2727	.4000	.4000	.4545	1.0000											
10	.4545	.6000	.4545	.4545	.2727	.4000	.4000	.4545	.2000	1.0000										
11	.6364	.6000	.4545	.6364	.0909	.2000	.2000	.2727	.2000	.2000	1.0000									
12	.6000	.5556	.4000	.6000	.2000	.3333	.3333	.4000	.1111	.1111	.1111	1.0000								
13	.3333	.0909	.1667	.1667	.5000	.6364	.6364	.5000	.4545	.6364	.6364	.6000	1.0000							
14	.2727	.4000	.4545	.2727	.8182	.6000	.6000	.6364	.6000	.6000	.8000	.7778	.2727	1.0000						
15	.4545	.4000	.4545	.4545	.6364	.4000	.4000	.4545	.6000	.8000	.6000	.7778	.2727	.2000	1.0000					
16	.6000	.5556	.6000	.6000	.6000	.3333	.3333	.4000	.7778	.7778	.5556	.7500	.4000	.3333	.1111	1.0000				
17	.4545	.4000	.2727	.4545	.0909	.4000	.4000	.2727	.4000	.4000	.2000	.3333	.4545	.8000	.6000	.5556	1.0000			
18	.4545	.6000	.4545	.6364	.2727	.4000	.2000	.0909	.6000	.6000	.4000	.5556	.4545	.6000	.4000	.3333	.2000	1.0000		
19	.2727	.4000	.2727	.4545	.2727	.2000	.4000	.2727	.6000	.6000	.4000	.5556	.4545	.6000	.4000	.3333	.2000	.2000	1.0000	
20	.4545	.6000	.4545	.6364	.2727	.4000	.2000	.0909	.6000	.6000	.4000	.5556	.4545	.6000	.4000	.3333	.2000	.018	.2000	1.0000

相似系数和遗传距离是衡量遗传多样性的重要指标,常用来判断不同个体间的亲缘关系,当相似系数为0时,表明两个个体完全不一样,无亲缘关系;当相似系数为1时,表明两个个体完全一样。通过统计9条随机引物的RAPD扩增结果,计算了冬虫夏草的相似系数。反之,遗传距离为1时表明两个个体完全一样,遗传距离为0时两个个体完全不一样,无亲缘关系。由表3-7可知,相似系数的变化范围在0.1818-0.9876之间,其中样品18和20的相似系数最大为0.9876,表明他们的亲缘关系最近。样品4和7之间的相似系数最小为0.1818,表明它们之间的亲缘关系比较远。由以上数据可以看出不同产地冬虫夏草之间的个体遗传多样性比较丰富。

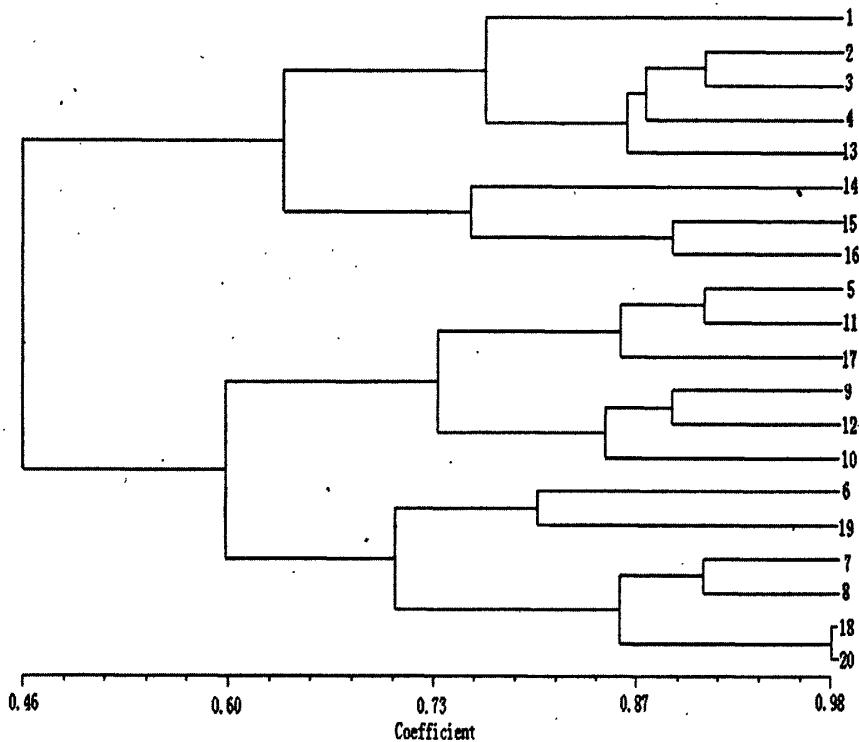


图 3-11 20 个实验样品的聚类分析树状图

Fig3-11: 20 samples dendrogram with the method of UPGMA

聚类分析图表明,实验样品在相似系数 0.60 左右可以划分为 3 组。第一组包含 8 个冬虫夏草样品个体, 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 这 8 个样品都是取自玉树州。第二组包含 6 个样品, 5, 11, 17, 9, 12, 10, 其中 5 号样品取自海南州兴海县, 其他来自果洛州。第三组包含 6 个样品, 6, 19, 7, 8, 18 和 20, 其中 6, 7, 8 来自海南州兴海县, 18, 19, 20 为果洛州达日县样品。

第四章 讨 论

4.1 基因组 DNA 的提取与纯化

基因组DNA的提取和纯化是分子生物学研究工作中重要的基本技术,也是进行PCR分析的物质基础。提取的DNA样品质量的好坏往往是分子生物学下一步实验成败的关键。本实验的每个样本都取整株虫草提取基因组DNA。研究表明,冬虫夏草不同部位在RAPD标记上无显著差异^[71]。因此,取材部位的微小差异不致影响实验的结果。而基因组DNA的提取的关键与否取决于材料的新鲜程度,如果样品储存时间较长或用于干燥的材料进行DNA的提取,效果肯定没有新鲜的材料好。就本实验而言,选用的冬虫夏草材料是比较干燥的,而且保存的时间较长,这就会造成基因组DNA的部分降解。再者,冬虫夏草含有大量的虫草多糖类,蛋白质和酚类物质^[72]。尤其是多糖类物质容易形成粘稠的胶状物,这些胶状物既难溶解,又能抑制Taq酶活性,多酚类物质不仅极易被氧化而发生褐变,而且也可抑制Taq酶的活性,这就无形中对DNA的提取和纯化带来不小的影响。因此,为了提高DNA提取的得率和质量,本实验对所用材料进行了前处理。用到去离子水,75%乙醇浸洗。这样做就有效的防止表皮残留物以及次生代谢物对基因组DNA的提取影响。材料直接加液氮粉碎研磨是现今提取基因组DNA材料处理的通用办法^[73],充分的研磨可以抑止DNase酶活性,防止DNA降解。由于DNA在异丙醇中的沉淀速度大于多糖、色素等物质,因此,加入异丙醇后一旦有沉淀产生,立即用灭过菌的牙签将DNA挑出,后用乙醇洗涤,可有效地去除杂质。

现今对基因组DNA提取的方法根据所用去污剂的不同,可以分为两种:一种是SDS法,另一种是CTAB法^[74]。这两种方法已经被广泛应用到各个不同物种的基因组DNA的提取上,步骤也非常成熟。因此,为了探寻合适的冬虫夏草基因组DNA的提取方法,本实验分别采用SDS法和改良的CTAB法进行DNA的提取。两种方法的实验步骤大体相同,不同之处在于提取液的成分。CTAB法中的提取液运用高盐低PH的提取环境,提高了细胞的破碎程度和DNA的释放速度,并通过高浓度的CTAB最大程度的结合多糖,去除中性和酸性蛋白质。CTAB法中用到的 β -巯基乙醇是一种常用的抗氧化剂,它提供具有还原作用的巯基,可以有效的防止细胞内次生产物的氧化从而避免了DNA褐变得发生。因此最终选用CTAB法提取冬虫夏。

在DNA提取和纯化过程中,根据实际情况适当作出一些改变。将水浴时间加长1-3个小时,让CTAB能更加充分结合蛋白等大物质。在纯化时加入等体积苯

酚/氯仿/异戊醇,有效的去除了由于褐变形成的物质。在最后提取DNA白色絮状物溶解时,没有用TE溶液而是改用DEPC水。因为TE溶液是弱碱性虽然可以保护DNA,但是对PCR的反应体系有一定的影响。最后在DNA保存和使用过程中过低温和频繁融冻也会导致DNA断裂,长期保存的DNA在-20℃低温冰箱中保存,常使用的DNA模板保存在4℃冷藏冰箱中。

4.2 RAPD-PCR 的优化条件

在实际实验中, RAPD 反应的结果确实受到很多因素的影响。以下将对各个因素进行一一的讨论。

RAPD 反应对模板 DNA 质量要求并不高,各种方法提取的 DNA 均能获得一致的扩增结果,模板中含有少量的蛋白质和 RNA 对扩增结果无影响。但是用 CTAB 方法提取 DNA 时,用到了酚,氯仿等无机溶剂,少量的无机溶剂的残留可使 Taq 酶失活。使用时可以在保证 DNA 浓度的前提下适当稀释其浓度以降低抑制能力。本实验将提取的基因组 DNA 稀释 10 倍作为 PCR 的模板 DNA 原始浓度。模板 DNA 浓度过低,分子碰撞的几率低,偶然性大,扩增产物不大稳定。浓度过高,又会相应的增加非特异性产物的扩增,造成弥散型电泳结果。如果模板 DNA 浓度太高,则根本没有扩增带出现。RAPD 扩增对 DNA 浓度有较宽的耐受范围。通过参阅有关文献^[67],表明模板 DNA 的用量有一定得变动范围,因此,在正式 PCR 之前,要对模板 DNA 的浓度进行优化实验,确定最佳的浓度条件。

RAPD 所用的是随机引物,虽然是随机引物,但使对引物的设计首先要避免的就是自身的碱基配对。文献表明,C+G 的含量在 50 %-80 %的时候对 RAPD 效果最好^[75]。因此,引物的优化对实验也是个重要因素,浓度过小可能无扩增带出现,反之,非特异性扩增产物将增多,产生引物二聚体。

Mg²⁺浓度是影响 PAPD 的又一重要因素,Mg²⁺浓度不仅是 TaqDNA 聚合酶实现聚合反应的必须的物质,而且还要影响反应的特异性和扩增效率。Mg²⁺的浓度对引物退火温度、扩增产物特异性的强弱。引物二聚体的形成以及 DNA 聚合酶的活性和精确度产生一定的影响。Mg²⁺浓度过低时,酶活力显著下降,过高时,会导致非特异性扩增产物的积累,对酶有一定的抑制作用。一般文献中 RAPD 反应体系的 Mg²⁺适宜浓度为 1.5-2.0 mmol/L^[72]。因此,实验中 Mg²⁺浓度的优化保证 RAPD 扩增的稳定和多态^[41]。

dNTP 作为原料参与 PCR 反应中新链 DNA 的合成,使用浓度为 50-200 $\mu\text{mol/L}$ ^[72],dNTP 浓度过高会导致聚合酶错误的加入,浓度过低,会影响合成

效率,甚至会因 dNTP 过早消耗完,使产物单链化,扩增效果严重打折。

通过查阅文献^[34],得知 Taq 酶用量过大,会产生非特异性条带,扩增产物的电泳呈现弥散状。酶用量过少,导致扩增产物减少,RAPD 反应扩增的质量与 Taq 酶的用量密切相关。大量 Taq 酶不仅会造成不必要的浪费,还容易出现电泳弥散。Taq 酶用量过低使新链合成效率下降^[76]。所以 Taq 酶的用量是 RAPD 扩增反应的难点是关键点。

综上所述,本实验在充分考虑缓冲体系、扩增程度等因子的基础上,选取了反应成分中模板 DNA 浓度,引物浓度,dNTPs 的浓度, Mg^{2+} 浓度及 Taq 酶用量 5 个重要因子,通过正交试验得到了冬虫夏草 RAPD-PCR 的最佳扩增体系为:20 μ l 总反应体系戏中包含,35 ng 模板 DNA,2.0 U Taq 酶,0.4 μ mol/L 引物,0.2 mmol/L dNTPs,1.5 mmol/L Mg^{2+} 。

确定了最适的反应体系后,仍需对扩增程序参数作进一步的优化实验。退火温度,循环次数也是影响 RAPD 反应的因素,具有相对的灵活性,是进一步优化 RAPD 反应及 RAPD 技术程序化的重要控制措施。退火是引物与模板 DNA 单链相结合配对的过程,它是按照碱基互补配对原则进行的。退火温度的选择与引物的长度、C+G 的含量有关。在 RAPD 分析中,一般的退火温度为 35-40 $^{\circ}C$,时间 30-90 S^[37]。因此退火温度是关键点。当循环次数少时,扩增产物的量对于数据分析太少,当循环次数过多时,扩增的量不再增加,达到饱和状态。通常扩增在 30-45 个循环^[37]。通过梯度试验最红确定了最佳退火温度为 37 $^{\circ}C$,进行 40 次循环。

除此之外,影响RAPD结果的还有一些不可避免的因素,一般分为人为因素和机器的误差。人为因素是指在RAPD实验中,一些细微的技巧如果不注意也会影响RAPD带纹图谱,比如由于配制RAPD反应混合物都是微量操作,稍不注意加的量就不正确,从而就影响RAPD的结果。PCR仪的性能对RAPD结果有细微影响^[77],性能优越的PCR仪有较快的温度变化率和在特定度上的稳定性,这样在比较短的时间内达到设定温度并且波动幅度比较小。PCR反应管的管壁厚薄直接影响传热性能,从而影响反应体系的反应温度,本实验进行中就出现由于PCR反应管质量差,造成扩增结束后管内扩增产物明显减少的现象。因此实验人员的规范化操作是关键。由同一个人操作,每个引物对全部样品的扩增在同一个PCR反应中完成就能尽量避免干扰。

总之,RADP的灵敏度高,影响因素多,要得到稳定可靠的实验结果,应根据具体情况采用科学的方法优化反应体系。本实验采用了正交设计来确定最佳扩增体系。

4.3 RAPD 扩增结果的统计与聚类分析

0/1矩阵是RAPD扩增图谱的统计方法,也是利用软件进行聚类分析的数据基础。如果0/1矩阵得记录出现错误,将会直接影响数据分析的可靠性。现今0/1矩阵的数据记录国内实验室主要是人工读带,由主观原因造成的误差必不可免,最好由多人对条带统计后作比对以减小误差。本实验条带的统计遵循了以下的原则:

(1)只记录易于辨认的条带,排除模糊不清的带。

(2)在所比较的泳道中无法准确标识的带应予以排除。

(3)迁移率相同,但强度不同的带,当强带的强度超过弱带的2倍时,不应该将它们当作是相同的带。

0/1 矩阵的聚类法一般可以分为五类:UPGMA 法,邻接法(NJ),相关邻居法,变形距离法和最小进化法,研究 DNA 遗传标记多采用 UPGMA 法和 NJ 法。本实验所用得就是 UPGMA 法构建树状图。

UPGMA 法首先把待研究的各个分类群或运算分类单位看作是独立的一类,然后计算各个单位之间的距离或相似系数,将距离最小或者相似系数最大的两个单位合并为一类,再计算合并而来的新类与其余各类之间的距离或相似系数,选择相互间距离最小或者相似系数最大的两个单位合并,每合并一次减少一类,如此继续下去,直至将所有的样品合并成一类为止。这种方法可以直观的反映出类群间的遗传多样性,便于进一步的研究其亲缘关系及遗传分化趋势。

第五章 结 论

5.1 通过 2 种基因组 DNA 提取方法的比较, 选择 DNA 提取电泳图谱中条带清晰, 降解的程度比较低的方法。本实验选用了改良的 CTAB 法, 适用于冬虫夏草 DNA 的提取。

5.2 在 RAPD 稳定性技术的探讨中, 对反应体系中模板 DNA 浓度, Taq 酶浓度, 引物浓度, dNTPs 的浓度, Mg^{2+} 浓度 5 个重要因子进行了正交试验, 筛选出最佳的反应体系。并在此最佳体系的基础上, 分别对退火温度, 扩增循环数进行了单因素试验, 得到了 RAPD 反应合理的程序, 确定了冬虫夏草 RAPD 反应体系和 PCR 扩增条件, 35 ng 模板 DNA 浓度, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物浓度, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 2.0 U Taq 酶。最终扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 S, 37 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2min, 40 次循环。

5.3 以优化好的反应体系为基础, 从 40 条随机引物中筛选出 9 条, 这 9 条引物对不同产地冬虫夏草 20 个 DNA 样品进行 PCR 扩增, 共检测到 65 个位点, 平均每条引物检测到 7.2 个位点, 其中呈多态性位点 57 个, 平均多态性条带数为 6.3 条, 多态性位点比率 P 为 87.69 %, 9 个引物的多态位点比率从 75 %--100 % 不等。

5.4 本实验对玉树县, 称多县, 达日县, 马沁县和兴海县 5 个地区的 20 个冬虫夏草个体使用了 9 条随机引物进行扩增, 得到了他们的 RAPD 谱带。根据 RAPD 谱带统计出个体间的遗传距离显示, 来自同一地区的冬虫夏草的遗传距离较小, 而来自不同地区的冬虫夏草的遗传距离较大。从 UPGMA 法聚类结果也可以看出玉树县和称多县的冬虫夏草样品与其他地区的样品差异显著, 在相似系数为 0.60 处明显分开, 在树状聚类图上为相对独立的一支。这与陈永久的结果一致^[78]。其他地区的样品遗传背景相比之下比较特殊。我们不难看出相同来源地的样品大多能首先聚类, 说明它们之间亲缘关系较近, 但具有比较丰富的遗传多样性。可能由于地理位置的不同, 西部地区受地理条件的限制, 长期交通不便, 人为选择、干扰较小, 使原始的遗传变异保留较多。其生长环境发生了变化, 体内的代谢过程发生了一定的改变, 使其遗传物质 DNA 发生了一定的变异所致。但是总体上产地的不同直接影响着聚类的结果。揭示出其遗传多样性具有一定的地域相关性。

参考文献

- [1].敬一兵,陆鲁生.虫草[M].昆明:云南科技出版社,1986,5-54.
- [2].清水大典.原色冬虫夏草图鉴[M].东京:诚文堂新光社,1994,208-209.
- [3].姚一建,李玉,主译 Alexopoulos CJ.Mims CW, Blackwell [M] M.Introductory Mycology (4th.-ed).北京农业出版社,2002,1-771.
- [4].张智,谢意珍,李森柱等.冬虫夏草研究进展[J].微生物学杂志.2002,22(5):51-62.
- [5].陈慧芳.含有冬虫夏草提取物的保健饮料和药物[M].国外医药.植物药分册,1998,13(3):139.
- [6].陈宏玲.冬虫夏草的研究进展[J].中国实用医药杂志.2007.3(7):108-109.
- [7].杨大荣,李朝达等.中国蝠蛾属昆虫种类和地理分布研究[J].昆虫学报,1996,39:414-422.
- [8].刘易进,郭兰英,俞永信等.冬虫夏草无形阶段的分离和鉴定[J].真菌学报,1989,3:67-68.
- [9].施立明,贾旭,胡志昂.遗传多样性[M].陈灵芝编,中国的生物多样性.北京:科学出版社,1993.
- [10].葛颂,洪德元.遗传多样性及其检测方法[M].中国科学院生物多样性委员会主编,生物多样性研究的原理与方法.北京:中国科学技术出版社,1994,123-139.
- [11].沈浩,刘登义.遗传多样性概述[J].生物学杂志.2001,18(3):5-7.
- [12].夏铭.遗传多样性研究进展[J].生态学杂志.1999,18(3):59-65.
- [13].贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[M].中国农业科学.1996,29(4):1-10.
- [14].陈锡文,赵惠玲.分子标记技术及其应用[M].实验动物科学与管理.2005,22(1):48-50.
- [15].刘树兵,王洪刚,孔令让等.现代植物品种改良的途径.特点及发展趋势[J].山东农业大学学报(自然科学版),1999,30(1):73-78.
- [16].温学森,杨世林等.花果数量性状在地黄种质资源鉴定中的应用价值[J].中草药.2002,33(10):1121.
- [17].梁洪卉,程舟.青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 分析[J].中草药.2005,12(36):1895-1863.
- [18].Merrell D J.生态遗传学[M].黄瑞复等译.北京:科学出版社,1991,25-36.
- [19].王镭.遗传标记的研究进展[J].生物技术,2002,12(2):230-234.
- [20].石大兴,王米力.墨西哥辣椒的核型研究[J].四川农业大学学报,1995,13:292-294.
- [21].王正询,林兆平,潘坤清.蕉类的细胞遗传学研究[J].遗传学报,1994, 21(6): 453-462.
- [22].明军,张启祥等.园林及园艺植物品种鉴定常规技术研究进展[J].世界林业研究,2002,15(6):14-20.
- [23].王晓辉,樊冬丽,蒋霞云.遗传标记技术研究进展[J].育种研究,2008,228(4):39.
- [24].吴若菁.天然马尾松群体遗传结构的研究[J].林业科学,2002,38(5):160-162.

- [25].Market,C,and Moller, Multi Pleforms of enzymes: Tissue, onto genetic and Species Specific Patterns Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.1995,45:753-763.
- [26].Horry J P, Jay M. Distribution of anthocyanins in wdd and cultivated banana varieties[J]. .Phytochemistry. 1988. 27(8):2667-2672.
- [27].周厚高,张西丽,王中仁等.几个百合品种遗传亲缘关系的等位酶分析[J].西南农业学报, 1999,12(04): 92-95.
- [28].曹越.植物遗传研究与分子标记技术[J].青海农林科技.2004,(2):21-24.
- [29].管敏强,陈锡文.分子标记技术及其应用[M].实验动物科学与管理.2005,22(1):48-50.
- [30].Williams J G K, Kubeli D A R , Liak K J. DNA Polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res,1990,18:6531-6535.
- [31].王臻昱,许艳丽,高继国.分子标记及其在大豆抗性基因定位中的应用进展[J].大豆通报,2008,2:14-15.
- [32].鄂洋,林凤.分子标记技术在玉米大斑病抗性基因研究中的应用[J].玉米科学,2009, 17(3): 64-67.
- [33].俞和韦.贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性分析[J].微生物报.2008,4(4):439-445.
- [34].朱玉贤,李毅.现代分子生物学[M].第 2 版.北京:高等教育出版社,2002.
- [35].章卫民等.西藏冬虫夏草无性型的分子生物学研究[J].微生物学通报.2002,2(3):54-58.
- [36].魏鑫丽,郭英兰,沈南英.冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析[J].菌物学报.2006, 25(2):192-202.
- [37].赵锦,王宁,陈月琴.等.冬虫夏草无性型的分子鉴别[J],中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1):121.
- [38].张泽文等.古尼虫草无性型的分子鉴别[J].菌物学报.2005,24(3):344-348.
- [39].Zeitkiewicz, E.A. Rafalski and D.Labuda. Genome fingerprinting by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification.Genomics 1994,20:176-183.
- [40].黎裕,贾继增,王天宇.分子标记的种类及其发展[J].生物技术通报.1999,(4):19.
- [41].梁洪卉,程舟.青海省冬虫夏草的遗传变异及亲缘关系的形态性状和 ISSR 分析[J].中草药.2005,12(36):1895-1863.
- [42].Kresovich S,Bliek SM. Abundance and characterization of simple-sequence repeats SSRs isolated from a size-fractionated genomic library of Brassica napus L. rapeseed.[J].Theor Appl G -enet.1995,91:206-211.
- [43].Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP :a new technique for DNA Fingerprinting[J].Nucleic Acids Res 23(21):4407-4414.
- [44].曹晖,张英.DNA 分子标记技术在中药品质与标准化方面的研究概况[J].世界科学技术中医药现代化.2003,5(1):39-47.

- [45]. Welsh J, Honeycutt R J, McClelland M, et al. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. TAC. 1991, 82: 473-475.
- [46]. 张晓波. 野牛草种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[D]. 山西, 山西农业大学, 2005: 8-11
- [47]. 唐炎林. 花椒种质资源 RAPD 反应体系的建立及应用分析[D]. 四川, 西华师范大学, 2005: 13-15.
- [48]. 李楠, 宋健国, 刘金云等. 蛹虫草与冬虫夏草化学成分比较[J]. 吉林农业大学学报. 1995, 17: 80-83.
- [49]. 白云娥, 李青山, 王毅等. 冬虫夏草多糖的含量测定[J]. 山西医科大学学报. 2000, 31(2): 129-130.
- [50]. 许周善, 周晓燕. 冬虫夏草多糖的研究进展[J]. 工业微生物. 2000, 30(1): 56-57.
- [51]. 纪莎, 施小兵, 易骏. 冬虫夏草化学成分研究概况[J]. 福建中医学院学报. 1999, 9(2): 46-47.
- [52]. 张智, 谢意珍, 李森柱. 冬虫夏草研究进展[J]. 微生物学杂志. 2002, 22(5): 51-53.
- [53]. 汪宝琪, 庞志功. 西藏冬虫夏草有效成分研究[J]. 西藏科技. 1995, 2: 16-18.
- [54]. 张平. 虫草属真菌研究进展[J]. 生物学杂志. 2003, 20(6): 43-45.
- [55]. 王伟, 陈湛昌, 钟英长等. 粤北一种虫草分离菌的抗酵母现象[J]. 微生物学通报. 2003, 30(2): 1-4.
- [56]. 程显好, 白毓谦. 冬虫夏草菌丝体及发酵液中抗菌活性物质的初步研究[J]. 中国食用菌. 1996, 14(3): 37-38.
- [57]. 陆龙喜, 刘淑梅, 时连根. 冬虫夏草研究的新进展[J]. 生物学通报. 2003, 37(6): 4-6.
- [58]. 刘礼平, 龙新等. 冬虫夏草寄生昆虫—虫草蝠蛾[J]. 昆虫天敌. 1995, 17(4): 184-190.
- [59]. 向敏. 冬虫夏草生物学教学[M]. 2004, 29(1): 56-57.
- [60]. 龙絮新. 冬虫夏草的研究与利用[J]. 昆虫天敌. 1992, 14(2): 96-100.
- [61]. 暴增海. 我国的虫草资源及其开发利用现状与展望[J]. 昆虫天敌. 1994, 12(1): 49-53.
- [62]. 李志超, 杨姗姗. 食药菌生产与消费指南[M]. 北京: 中国农业出版社. 1997: 289-295.
- [63]. 杨业华. 普通遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [64]. 于超, 何俊, 琳曾纬等. 康定冬虫夏草与人工虫草的 RAPD 指纹图谱比较研究[J]. 中草药. 2005, 36(2): 274-277.
- [65]. 李增智, 黄勃, 李春如等. 确证冬虫夏草无性型的分子生物学证据[J]. 菌物系统. 2000, 19(1): 60-64.
- [66]. Chen Y J, Wang W, Yang Y X. Genetic divergence of *Cordyceps sinensis* estimated by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. Acta Genet Sin, 1997, 24(5): 410-416.
- [67]. 张云武, 陈永久, 沈发荣. 滇西北地区冬虫夏草和阔孢虫草的遗传分化研究[J]. 菌物系统. 1999(18): 176-183.
- [68]. 钟军, 李询. 芸芥总基因组 DNA 的一种提取方法[J]. 生物技术, 2002, 12(5): 18-19.

- [69].Murray MG,Thompson WF.Rapid isolation of molecular weight plant DNA [J].Nucl Acids. Res,1980,(8):4321.
- [70].L.G.戴维斯,M.D.狄伯纳.分子生物学基本实验方法[M].张钰译.复旦大学出版社.1998.
- [71].陈永久,王文等.冬虫夏草的随机扩增多态DNA及其遗传分化[J].遗传学报,1997,24(5): 410-416.
- [72].汪永庆,徐来祥.RAPD 技术的标准化问题[J].动物学杂志,2000,35(4):57.
- [73].刘哲,刘庆平.几种基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].技术论坛.2008,10:54-56.
- [74].曹琳.不同种类中药材的 DNA 提取方法[J].中药与天然药.2004,06(04):65-69.
- [75].Yu, K. F., K.P. Pauls. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. Nucleic Acids Research,1992,20(2): 606.
- [76].Bardin, M.G, C. Bandi, S. Cominicini et al. Rapid analysis of genetic diversity in cattle populations using amplification of bulked genomic DNA samples. Animal Genetics, 1994,25(Suppl. I): 29.
- [77].陈永久,张亚平.随机扩增多态 DNA 影响因素的研究[J].动物学研究,1997,18(2): 221-227.
- [78].陈永久,杨大荣.青藏高原七个地区冬虫夏草的分子进化研究[J].中国科协第三届青年学术年会.1998.

致 谢

本论文是在导师罗桂花教授的悉心指导下完成的。导师渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。不仅使我树立了远大的学术目标、掌握了基本的研究方法，还使我明白了许多待人接物与为人处世的道理。本论文从选题到完成，每一步都是在导师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血。在此，谨向导师表示崇高的敬意和衷心的感谢！

本论文的顺利完成，离不开各位老师、同学和朋友的关心和帮助。在此感谢胡静老师的大力支持和帮助。感谢龚伯奇，陈开华，梅后敏，路朋，祁永青，刘涛，等同学的关心和帮助！

感谢父母养育之恩和在生活中一如既往的支持、鼓励和关怀！感谢家人对我的理解和支持！

个人简历

姓名: 王伟 性别: 男 学历: 硕士
出生年月: 1983 年 2 月 12 日 健康状况: 健康
毕业院校: 青海省师范大学 专业: 生态遗传学
电子邮件: wanghaofan123@163.com 联系电话: 13997194054
通信地址: 青海师范大学男 4 舍-231 室 邮编: 810000
政治面貌: 中共党员

教育背景:

2001 年-2005 年 湖南省中南大学 生物工程 专业 学历: 本科
2007 年-2010 年 青海省师范大学 生态遗传 专业 学历: 研究生

主修课程:

高级生物化学, 分子生物学, 细胞生物学, 生态遗传学, 天然产物化学,

仪器分析

在学期间发表的学术论文

1. DNA 标记技术在冬虫夏草遗传多样性研究中的应用 宜春学院学报
2. 贝母鉴定方法研究进展 安徽农业科学
3. 高寒草甸不同植被类型土壤全氮含量变化动态分析 生态环境学报

