

25 份燕窝样品的线粒体细胞色素氧化酶 I 基因序列分析

谢彩玲^{1,2}, 陈念^{1*}, 潘柯伊³, 王乾蕾³(1.中山火炬职业技术学院健康产业学院, 广东 中山 528436; 2.国家中药现代化工程技术研究中心中山健康产品分中心, 广东 中山 528436; 3.中山市食品药品检验所, 广东 中山 528400)

摘要: 目的 对多种燕窝进行 DNA 条形码鉴别, 为确定燕窝的基原提供分子依据。方法 对 25 份燕窝样品的细胞色素氧化酶 I(mitochondria cytochrome oxidase subunit I gene, COI)条形码序列进行 PCR 扩增和测序, 分析燕窝正品来源的种内变异, 与混伪品的种间变异, 以及序列相似性和进化树研究, 用 Taxon DNA 软件评估“Barcoding Gap”。结果 金丝燕种内 COI 序列变异小, 种间存在较多的变异位点, 种间的遗传距离显著大于种内的遗传距离。通过构建的系统聚类树图可以看出, 燕窝不同来源个体均聚在一起, 能够与其混伪品区分开。结论 基于 COI 序列的 DNA 条形码技术可以用于鉴定燕窝的正品来源及其混伪品。

关键词: 燕窝; DNA 条形码; 线粒体细胞色素氧化酶 I 基因; 鉴定

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)03-0334-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.008

引用本文: 谢彩玲, 陈念, 潘柯伊, 等. 25 份燕窝样品的线粒体细胞色素氧化酶 I 基因序列分析[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 334-338.

Analysis of Mitochondria Cytochrome Oxidase Subunit I Gene of 25 Samples of Bird's Nests

XIE Cailing^{1,2}, CHEN Nian^{1*}, PAN Keyi³, WANG Qianlei³(1.Department of Health Industry, Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan 528436, China; 2.Zhongshan Health Products Center, National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528436, China; 3.Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan 528400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify DNA barcodes of bird's nest to provide molecular basis for the substrate of bird's nest. **METHODS** Mitochondria cytochrome oxidase subunit I gene(COI) fraction from 25 bird's nest samples was amplified by PCR method and sequenced. Then the intraspecific variation among the bird's nest samples and interspecific variation between bird's nest samples and fakes were analysed. Furthermore, the Barcoding Gap was evaluated by using Taxon DNA software. **RESULTS** The intraspecific variation among swiftlet was small. While many variation loci were found in different swiftlet species, and the genetic distance between species was significantly greater than the intraspecific genetic distance. Phylogenetic tree was constructed, in which the bird's nest samples from different sources were clustered together, while the fakes were distinguished from the bird's nest samples. **CONCLUSION** DNA barcode technology based on COI sequence can be used to distinguish the original source of bird's nest and its confounding products.

KEYWORDS: bird's nest; DNA barcode; COI; identification

燕窝是指雨燕目雨燕科部分雨燕和金丝燕属的几种金丝燕分泌出来的唾液, 再混合其他物质(如: 羽毛)所筑成的巢穴, 其中尤以金丝燕的唾液蛋白质纯度和营养价值最高^[1]。燕窝主产于印度尼西亚、缅甸、泰国、日本等地以及中国的广东、福建等沿海地区, 多形成于人迹罕至的悬崖峭壁或岩洞之中。燕窝味甘、性平, 归肺、胃、肾经, 由于具有养阴润燥、益气补中和化痰止咳等功效, 常用于治疗久病虚损、肺癆咳嗽、痰喘、咯血、吐血、久痢、久疟、噎膈反胃、体弱遗精、小便频数等病症^[2]。

燕窝为宜药宜膳的珍贵药材, 其质量与产地和出产环境密切相关, 由于其药用价值和价格较高, 时常会有假冒或掺假产品出现在市场上, 多以猪皮、银耳、琼脂、鱼胶与植物枝叶加工伪造。燕窝中有称为“血燕”的, 是因为金丝燕的食物中包含海藻等物使其唾液含杂质, 呈红丝而名, 并非因为人们误解, 以为其未完成鸟巢, 忍住不产卵, 吐血而形成。现有的燕窝鉴别方法虽可在一定程度上鉴别燕窝与其伪品, 但无法确定燕窝的基原和产地等质量问题^[3-5]。

本研究利用动物 DNA 条形码研究的标准序

基金项目: 广东省教育厅基础研究重大项目及应用研究重大项目(自然科学)(2017GKZDXM014); 中山市社会公益科技研究项目(2016B2125)

作者简介: 谢彩玲, 女, 讲师 E-mail: 461879222@qq.com *通信作者: 陈念, 男, 博士, 副研究员 E-mail: 2218972568@qq.com

列——线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(mitochondria cytochrome oxidase subunit I gene, COI)序列,对多种市面上出售的燕窝进行鉴别,分析药材的基原与其他物种之间的变异性、系统树中物种的聚类情况,考察利用 COI 序列鉴别燕窝与其混伪品的可行性。

1 仪器与试剂

1.1 药材和 DNA 序列

25 份燕窝样品材料采集自广东省各主要药材市场和药店,由广州中医药大学赖小平教授进行外观和显微形态学观察并初步鉴定为金丝燕属来源的燕窝;考虑到序列分析和燕窝近源物种混伪品鉴定的需要,还另外从 GenBank 上下载了雨燕(*Apus apus*, GenBank 登录号: AF543534.1)、烟雨燕(*Chaetura pelagica*, GenBank 登录号: AF168058.1)和企鵝(*Aptenodytes patagonicus*, GenBank 登录号: EU525303.1)对应的同源 DNA 序列作为参考。

1.2 试剂

基因组 DNA 提取试剂盒(3S Spin Genomic DNA Miniprep Kit V3.0, 上海申能博彩;批号: TQ201909001);蛋白酶 K(Amresco, 批号: 1156B030);琼脂糖(西班牙进口, Gene TECH 公司分装,批号: 101665);溴化乙锭(威佳公司;批号: 0492-25G);GoldView 核酸染料(批号: GV-21mL)和 DNA Marker(北京赛百盛基因技术有限公司,批号: M5000);PCR 反应试剂盒(包括 Buffer、dNTP 和 ExTaq 酶,批号: 2019A3)和 DNA 凝胶回收试剂盒(TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit V2.0,批号: DL005)均购自大连宝生物 TaKaRa 公司;引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

Thermal cycle 2720 PCR 仪(美国 ABI 公司);GS-15R 型高速冷冻离心机(美国 Beckmen);Q-plus 型纯水器(美国 Millipore 公司);DL-CJ-2F 实验医用型洁净工作台(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司);GDS7600 凝胶成像仪、DR45M 荧光透射仪、Grab-IT 2.59 凝胶成像分析软件均来自英国 UVP;SZX7 体视镜(奥林巴斯)。

2 方法

2.1 DNA 提取

称取燕窝样品 0.1 g,加入 1.2 mL CTAB 裂解

液(含 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl)裂解, 65°C 水浴 2 h, 前半小时轻轻摇动 4 次; 4°C $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 取上清, 加入等体积氯仿异戊醇混合均匀后, 4°C $12\,000 \times g$ 离心 5 min; 取上清加入 0.1 倍体积 10% CTAB/ $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 混合均匀后室温下放置 15 min; 然后加入与混合液等体积的氯仿异戊醇混合液, 混合均匀后, 4°C $12\,000 \times g$ 离心 5 min; 取上清, 加入 0.7 倍体积 -20°C 预冷的异丙醇, 混合均匀后马上 4°C $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 所得沉淀用 75%乙醇洗涤, 晾干乙醇。沉淀溶解于 $50 \mu\text{L}$ TE 溶液, -20°C 保存备用^[6]。

2.2 PCR 扩增

从 GenBank 上下载所有金丝燕属(*Aerodramus*)和雨燕属(*Apus*)物种的 COI 基因序列, 进行序列相似性比较, 找出其保守区; 根据保守区设计引物, 正向为 Cox1-F 5'-TCC TAG GAG ATG ACC AAA TC-3', 反向为 Cox1-R2 5'-AAC ATG TGG TGG GCT CAT AC-3'。PCR 反应体系总体积为 $25 \mu\text{L}$, 含 Buffer 和 dNTP 各 $2.5 \mu\text{L}$, 去离子水 $16.2 \mu\text{L}$, 正向和反向引物各 1.3 mL , mtDNA 模板 $1.0 \mu\text{L}$, ExTaq 酶 $0.2 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 5 min; 然后 35 个循环(94°C 0.5 min, 55°C 0.5 min, 72°C 1 min); 最后 72°C 延伸 10 min。用未加模板 DNA 的反应液作为空白对照以检查是否有污染存在。PCR 产物用琼脂糖凝胶(质量分数为 1.0%)电泳检测, 置于 -20°C 保存。

2.3 PCR 产物纯化和测序

扩增所得 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 切下所需条带用 Takara DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收, 并直接送上海生物工程公司进行正反双向测序, 以确保测序的准确性。

2.4 DNA 序列数据分析

测序峰图利用 Codon Code Aligner V2106 (Codon Code Co.)校对拼接, 去除引物区, 获得长度为 679 bp 的样品序列。对于从 Genbank 获得的 COI 序列或线粒体全基因序列, 采用 Codon Code Aligner V2106 软件, 与拼接好的样品序列比对后, 去除与样品序列相对应的 678 bp 以外的区段, 获得最终序列。将所有序列用 MEGA 410 软件比对并进行遗传距离分析, 用邻接(neighbor-joining, NJ)法对比对的序列构建系统聚类树, 利用 Bootstrap(1 000 次重复)检验各分支的支持率。用 TaxonDNA 软件评估 "Barcoding Gap"。

3 结果

3.1 物种分类

Blast 和系统聚类树分析表明 25 份燕窝样本中包含 2 种不同的燕窝品种,即 2 种不同的燕窝基原。其中样本 9 和样本 10 属黑巢金丝燕(*Aerodramus maximus*), 其余的 23 个样本属爪哇金丝燕(*Aerodramus fuciphagus*)。

3.2 种内变异

黑巢金丝燕有 2 个种内序列, 比对后序列长度为 679 bp, GC 含量分别为 48.19%~48.58%, 平均 GC 含量 48.38%, 含 2 个碱基变异位点; 爪哇金丝燕有 23 个种内序列, 比对后序列长度为 678 bp, GC 含量为 48.33%~50.00%, 平均 GC 含量 49.06%, 含 4 个碱基变异位点。结果见表 1。

种内平均 K-2P 距离为 0.000 6, 种内最大 K-2P 距离为 0.004 4, 种内 COI 序列变异程度较小, 见表 2。

表 2 燕窝种内的 K-2P 遗传距离
Tab. 2 K-2P genetic distance within species of bird's nest

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1																							
2	0.0000																						
3	0.0000	0.0000																					
4	0.0000	0.0000	0.0000																				
5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000																			
6	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015																		
7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000																	
8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015																
9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000															
10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000														
11	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030	0.0015	0.0015	0.0015													
12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000												
13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015											
14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000										
15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000									
16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000								
17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000							
18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000						
19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
20	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030	0.0015	0.0015	0.0015	0.0030	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015	0.0015				
21	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
22	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0030	0.0044		
23	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	0.0000	0.0030

表 1 COI 序列种内碱基变异(转换)情况表
Tab. 1 Table of base variation(conversion) within COI sequence clock

基原物种名称	具体类型	变异位点/bp	变异个数
黑巢金丝燕	C-T	501	1
	A-G	510	1
爪哇金丝燕	T-G	52	1
	C-T	53, 65	2
	G-A	128	1

3.3 种间变异

燕窝与其主要混伪品 COI 序列间存在较多的变异位点, 见图 1。种间平均 K-2P 距离为 0.213 6, 最小 K-2P 距离为 0.082 5。

3.4 燕窝及其混伪品 NJ 树

基于 COI 序列, 通过 NJ 法所构建的系统聚类树图可以看出, 燕窝不同来源个体均聚在一起, 支持率为 98, 同时也很容易与其余混伪品区别开来, 见图 2。因此 COI 条形码序列适用于药材燕窝与其混伪品的鉴定。

基因在动物条形码应用中的可行性。DNA 条形码在动物学研究中采用 *COI* 基因中的一段作为标准片段对物种进行快速、准确地识别和鉴定,已得到了广泛的应用。

本实验对 25 个不同来源的燕窝及其混伪品进行研究,发现燕窝种内 *COI* 序列有 12 个变异位点,以转换为主,种内平均 K-2P 距离为 0.000 6,种内最大 K-2P 距离为 0.004 4,种内 *COI* 序列变异较小;燕窝及其混伪品 *COI* 序列种间 K-2P 距离的平均值为 0.213 6,最小 K-2P 距离为 0.082 5。存在较多的变异位点,种间遗传距离显著大于种内遗传距离。同时,从基于 *COI* 序列构建的燕窝及其混伪品 NJ 树可以看出,燕窝不同来源个体均聚在一起,支持率较高,与其他混伪品能够很明显区分开。因此,基于 *COI* 序列的 DNA 条形码技术可以能快速直观地鉴定燕窝及其混伪品,为该药材准确鉴定提供了新的方法。

REFERENCES

- [1] ZHOU J H, DING Q, WANG S, et al. Research status of the edible bird's nest from southeast Asia[J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9(5): 957-973.
- [2] BAI W J, LIU X C, ZHANG X T, et al. Research progress on edible bird's nest composition and functional[J]. Food Sci Tech(食品科技), 2020, 45(5): 96-100.
- [3] 孔敏. 如何鉴别真假燕窝[J]. 中国防伪报道, 2017(8): 106-107.
- [4] 刘敬, 邓仙梅, 赵斌, 等. 近五年燕窝质量标准 and 药理功效研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(1): 190-196.
- [5] MA X T, ZHANG J K, CHEN Y, et al. Recent advances and future prospects in analytical techniques for authentication of edible bird's nest[J]. Food Sci(食品科学), 2019, 40(7): 296-303.
- [6] GUO L L, WU Y J, LIU M C, et al. Determination of edible bird's nests by FTIR and SDS-PAGE coupled with multivariate analysis[J]. Food Control, 2017, 80(1): 259-266.
- [7] WONG Z C F, CHAN G K L, WU L, et al. A comprehensive proteomics study on edible bird's nest using new monoclonal antibody approach and application in quality control[J]. J Food Compos Anal, 2018, 66(2): 145-151.
- [8] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B, 2003, 270(1512): 313-321.
- [9] SMITH M A, POYARKOV N A Jr, HEBERT P D. DNA BARCODING: *COI* DNA barcoding amphibians: Take the chance, meet the challenge[J]. Mol Ecol Resour, 2008, 8(2): 235-246.
- [10] BURNS J M, JANZEN D H, HAJIBABAEI M, et al. DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus perichares in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(17): 6350-6355.
- [11] YANG F, ZHOU L S, HE M Q, et al. Recent progress of DNA barcoding technique in animal medicine identification[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2018, 29(8): 1968-1970.
- [12] YAO H, ZHANG H, CHEN S L. Strategies and methods of DNA barcoding medicinal animals in Chinese Pharmacopoeia [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(9): 1137-1146.
- [13] 冯红英. DNA 条形码技术在动物类中药鉴定中的应用研究进展[J]. 光明中医, 2020, 35(4): F0003-F0004.

收稿日期: 2020-11-22
(本文责编: 曹粤锋)