

东南亚燕窝的 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列分析

刘敬^{1,2}, 陈念^{1*}, 王琼^{1,2} (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)

摘要: 目的 对实地采集的 25 份未进行任何加工的东南亚燕窝样品的 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列进行分析, 确定东南亚地区燕窝来源物种的真实身份, 其中包括 2 份珍贵的采集自马来西亚燕洞的黄燕和血燕标本。方法 25 份未经过任何加工的样品采集自马来西亚、新加坡和越南地区的燕洞和燕屋, 以直接提取自燕窝的基因组 DNA 为模板, 利用重新设计的引物扩增得到 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列, 并进行克隆测序。结果 测序结果与 GenBank 中的同源序列进行 BLAST 比对分析并构建亲缘关系树, 结合样品采集地的金丝燕种类信息初步确定爪哇金丝燕(*Aerodramus fuciphagus*)和大金丝燕(*Aerodramus maximus*)。结论 分析结果证实扩增的均为正确的来自对应金丝燕属的线粒体基因序列, 结合金丝燕种源地的物种分布资料和基因序列信息, 为制定进口燕窝的质量标准提供了依据。

关键词: 燕窝; DNA 鉴定; 12S 核糖体核糖核酸; 细胞色素 b 基因; DNA 测序

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)18-2229-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.010

引用本文: 刘敬, 陈念, 王琼. 东南亚燕窝的 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2229-2232.

Sequence Analysis of 12S rRNA and *Cytb* Genes from Bird's Nest in South-east Asia

LIU Jing^{1,2}, CHEN Nian^{1*}, WANG Qiong^{1,2} (1. Department of Health Industry, Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan 528436, China; 2. Zhongshan Health Products Branch, National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528436, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To confirm the real identity of imported bird's nest origin species in South-east Asia, the 12S rRNA and *Cytb* gene sequences from twenty-five bird's nest samples from South-east Asia were determined and analyzed, which including two precious bloody nest sample(yellow nest and bloody nest) collected from the birdnest cave in Malaysia. **METHODS** Twenty five samples without any processing were collected from birdnest cave and birdnest house in Malaysia, Singapore and Vietnam. The genomic DNA directly extracted from bird's nest was used as template to amplify 12S rRNA and *Cytb* gene sequences by redesigned primers, and then cloned and sequenced. **RESULTS** All the sequences were BLAST against their homologous sequences in GenBank database and the gene trees were constructed. Based on the species information of swiftlets collected in the sample collection area, these samples were initially identified as *Aerodramus fuciphagus* and *Aerodramus maximus*. **CONCLUSION** The sequence alignment analyses approve that they are the right mitochondrial gene from the *Aerodramus* species. Combined with the species distribution data and gene sequence information of the original swiftlets, these sequence data acquired by this method can be used to formulate the quality standard of imported bird's nest.

KEYWORDS: bird's nest; DNA identification; 12S rRNA; *Cytb*; DNA sequencing

燕窝即雨燕科动物金丝燕的唾液与绒羽等混合凝结所筑成的巢窝, 其别名有燕窝菜、燕蔬菜、燕菜、燕根等。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^[1]。

雨燕科(Apodidae)在分类学上属于动物界(Animalia)脊索动物门(Chordata)鸟纲(Aves)雨燕目(Apodiformes), 该科鸟类多结群营巢于岩洞、悬

崖峭壁的岩隙和楼、塔等建筑物的屋檐或顶部蔽风雨处, 它们翼尖长但足短, 因此飞行能力极强却不善行走, 它们常常结群飞翔在空中捕食各种昆虫。雨燕主要分布于东南亚及太平洋各岛屿上, 有些种类在高纬度地区繁殖而到热带地区越冬, 是著名的候鸟, 有些则是热带地区的留鸟^[2]。

燕窝一直以来都被作为一种名贵的传统中药滋补品, 在保健品市场上占有极为重要的地位, 但由于正品燕窝的价格昂贵, 劣质的燕窝产品在市场上大行其道。这些造假“燕窝”主要由鱼刺、

基金项目: 中山市社会公益类重大科研项目(2016B2125); 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)

作者简介: 刘敬, 女, 博士, 副教授 Tel: (0760)88291713 E-mail: 290914007@qq.com *通信作者: 陈念, 男, 博士, 副研究员 Tel: (0760)88291713 E-mail: 2218972568@qq.com

鱼骨,甚至银耳制成,虽然用海产品生产的“燕窝”通常有很浓的鱼腥味,以银耳冒充的液体“燕窝”则较黏稠而一般不易晃动,但在颜色和造型上均可以假乱真^[3]。替代品来源复杂、制伪手段无规律可行、产品类型复杂多样,这些因素都使得以形态鉴定为代表的四大类传统中药鉴定方法在燕窝面前却显得无用武之地^[4]。

大量研究表明,利用线粒体 DNA 序列分析对多数动物物种进行鉴定是非常有效的,该方法同样适用于对包括动物组织、附属物(如鳞片、羽毛)和分泌物(如蛇毒、唾液)在内的动物材料的来源物种身份的确定。本研究以实地采集的 25 份东南亚燕窝样品为实验材料,通过从中提取总 DNA 并对 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列进行了 PCR 扩增和序列分析,从而确定东南亚地区燕窝来源物种的真实身份。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料

共收集 25 份东南亚燕窝样本,分别编号 1~25 号,经广州中医药大学赖小平教授鉴定均为正品燕窝,燕窝样本来源情况见表 1。其中包括 2 份珍贵的采集自马来西亚燕洞的黄燕(10 号)和血燕标本(9 号),见图 1。样品在 40℃烘干后保存于广州中医药大学中药学院标本馆。

1.2 试剂和仪器

DP303 离心柱型基因组提取试剂盒和 DNA Marker III(天根生化科技有限公司,批号:DP-303,MD-103);PCR 产物胶回收纯化试剂盒(北京艾科基因技术有限公司,批号:AK-3201);蛋白酶 K(Amresco 公司,批号:0706);引物(上海生工生物工程有限公司合成,其中 12S rRNA 基因的扩增引物为 5'-AATCYTGTGCCAGCCACC-3'和 5'-CTTCCGGTACACTTACCTTG-3',其中 *Cytb* 基因的扩增引物为 5'-TCCACCCCTACTTCTCCAC-3'和 5'-GTTGGCTGGGGTGAAGTTTTTCG-3');dNTPs、PCR 缓冲液和 rTaq DNA 聚合酶[5 U·μL⁻¹,宝生物工程(大连)有限公司,批号:D226A]。

SZX7 型体视镜(日本奥林巴斯);PE-2400 型 PCR 扩增仪(美国 Perkin Elmers 公司);3730-XL 型 96 道毛细管基因分析仪(美国 ABI 公司);GDS-8000 型凝胶成像系统(美国 UVP 公司);BS124S 型万分之一分析天平(德国赛多利斯公司);BIO-RAD 凝胶成像仪(美国 BioRad 公司)。

表 1 燕窝样本来源

Tab. 1 Sample source of bird's nest

序号	名称	来源(产地)	收集时间
1	白燕(燕碎)	马来西亚沙巴州	2012 年 3 月
2	血燕(燕碎,洞燕)	马来西亚沙巴州	2012 年 3 月
3	血燕(燕条)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
4	白燕(燕盏)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
5	黄燕(燕盏)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
6	黄燕(燕饼)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
7	白燕(燕盏)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
8	血燕(燕角,洞燕,未加工)	马来西亚沙巴州	2012 年 3 月
9	血燕(燕条,洞燕,未加工)	马来西亚沙巴州	2012 年 3 月
10	黄燕(燕盏,洞燕,未加工)	马来西亚沙巴州	2012 年 3 月
11	白燕(燕条)	杏园春	2012 年 5 月
12	白燕(燕条)	民裕堂	2012 年 5 月
13	白燕(燕盏,屋燕,未加工)	印尼苏门答腊岛 JAMBI	2012 年 6 月
14	白燕(燕盏,屋燕,未加工)	马来西亚马六甲沿海	2012 年 6 月
15	白燕(燕盏,屋燕,未加工)	印尼苏门答腊岛棉兰	2012 年 6 月
16	白燕(燕碎)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 3 月
17	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛丹戎巴来市	2012 年 7 月
18	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛丹戎巴来市	2012 年 7 月
19	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛廖内省林加群岛	2012 年 7 月
20	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛亚齐市	2012 年 7 月
21	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛亚齐市	2012 年 7 月
22	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛杜里	2012 年 7 月
23	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛直名丁宜市	2012 年 7 月
24	白燕(燕盏)	印尼苏门答腊岛直名丁宜市	2012 年 7 月
25	白燕(燕饼)	新加坡龙标燕窝私人有限公司	2012 年 7 月



图 1 黄燕(10 号,左)和血燕(9 号,右)标本

Fig. 1 Yellow bird's nest(No.10, left) and bloody bird's nest(No.9, right) sample

2 方法

2.1 样品的制备和总 DNA 的提取

为尽量避免残留组织成分的损失,直接称取约 50 mg 不含羽毛和杂质部分的燕窝磨成粉末,按 DP303 离心柱型基因组提取试剂盒提供的说明书进行基因组 DNA 的提取。沉淀得到的 DNA 用 TE 缓冲液重新溶解,根据 260 nm 下的吸光度数值估

算其浓度,并调节为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 4°C 保存备用。

2.2 扩增反应和测序

参照 GenBank 公布的鸟类物种序列,使用 Clustal X 1.8 进行多序列比对,在系统总结前人设计的通用引物的基础上,对部分引物进行了修改,并由上海生工生物工程技术有限公司进行引物合成,其中 12S rRNA 基因的扩增引物为 5'-AATCYTGTGCCAGCCACC-3'和 5'-CTTCCGGTACACTTACCTTG-3',其中 *Cytb* 基因的扩增引物为 5'-TCCA CCCCTACTTCTCCAC-3'和 5'-GTTGGCTGGGGTGAAGTTTTTCG-3'。

以提取的总 DNA 为模板进行 PCR 反应,反应总体积为 $30 \mu\text{L}$: $1\sim 2 \mu\text{L}$ 模板总 DNA($100\sim 200 \text{ ng}$)、 $3 \mu\text{L}$ $10\times\text{Buffer}$ ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 9.0, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2)、 $2.4 \mu\text{L}$ dNTPs($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、上下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $1.2 \mu\text{L}$ 和适量的水,最后加 $0.2\sim 0.3 \mu\text{L}$ 高保真 Taq DNA 聚合酶。以下列循环参数为基础: 94°C 预变性 1 min , 94°C 变性 30 s , 55°C 退火 30 s , 72°C 延伸 1 min , 经 35 个循环后于 72°C 延伸补齐 5 min , 并根据不同引物的退火温度和扩增反应的实际效果进行优化。经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪记录结果。PCR 产物纯化和测序委托广州拓谱基因技术有限公司完成。SeqMan II 7.1 和 Chromas 2.33 对测序结果进行人工校对和拼接。

2.3 数据分析

将测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,初步推测其身份,随后使用 BioEdit v7.0.5.39 和 DAMBE 进行多重序列比对、统计分析和进化树的构建。

3 结果

3.1 12S rRNA 基因序列分析

PCR 产物长约 690 bp , 经 ClustalW 多重序列比对和核对测序峰图后除去两端不确定的区域,剩下有效位点 662 个,分为 619 个保守位点和 43 个多态性位点。在总共 25 条序列中,7 号和 18 号样品的序列完全一致,2, 8, 16, 19, 20 号样品的序列完全一致,23 和 25 号样品的序列完全一致,因此共分为 19 种不同的单倍型。将 43 个多态性位点提取出来,结果见图 2, 可见 9, 10 号样品与其他所有样品之间存在明显差异, 分别代表了 2 种不同的单倍群类型。

3.2 *Cytb* 基因序列分析

PCR 产物长约 440 bp , 经 ClustalW 多重序列比对和核对测序峰图后除去两端不确定的区域,剩下有效位点 396 个,除了 379 个保守位点外,仅有 17 个多态性位点。在总共 25 条序列中,共包括了 7 种不同的单倍型,其中 5 和 13 号样品的序列完全一致,然后除 8, 9, 14, 20, 21 号样品存在差异外,其他所有序列完全一致。结果见图 3。



图 2 从 12S rRNA 基因同源序列中提取的多态性位点
Fig. 2 Polymorphic sites extracted from homologous sequences of 12S rRNA gene

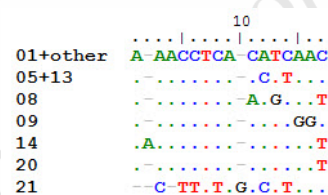


图 3 从 *Cytb* 基因同源序列中提取的多态性位点
Fig. 3 Polymorphic sites extracted from homologous sequences of *Cytb* gene

3.3 BLAST 检索

选择 2 号和 9 号样品的 12S rRNA 基因序列作为 2 种单倍型的代表进行 BLAST 检索,检索范围设定为“Apodidae”(雨燕科),结果发现,与 2 号样品相似性程度最高的排名前 5 位的物种均为 *Aerodramus fuciphagus*(爪哇金丝燕),最大相似度为 99%;与 9 号样品相似性程度最高的排名前 5 位的物种均为 *Aerodramus maximus*(大金丝燕),最大相似度为 98%。

选择 1 号和 21 号样品的 *Cytb* 基因序列进行 BLAST 检索,检索范围设定为“Apodidae”(雨燕科),结果发现,与之相似性程度最高的物种均为 *Aerodramus fuciphagus*(爪哇金丝燕),最大相似度为 99%。在本研究所分析的 25 份燕窝样品中,虽然根据多重序列比对结果直观看似 21 号样品的

DNA 序列包含较多的变异位点,但由于 *Cytb* 基因序列所含的多态性位点较少,因此并不意味着 21 号样品就来自不同的物种,另外,较为保守的 *Cytb* 基因序列显然无法提供足够的信息位点来区分上述 2 种物种所存在的差异。

4 讨论

燕窝的主要成分是蛋白质,总蛋白含量约为 50%~78%,主要为唾液酸糖蛋白^[5]。燕窝中的 DNA 来源则主要有 2 种途径,即唾液中脱落的口腔黏膜上皮细胞和混入燕窝中的绒毛或羽毛,后者又可分为 2 类,包括:①毛囊细胞及毛髓质部分没有完全角化的细胞,这些细胞含有细胞核及线粒体,可抽提到 nDNA 和 mtDNA;②毛干的角化细胞,这些细胞的细胞核已经退化转移,而线粒体尚未完全退化转移,可抽提到 mtDNA^[6]。毛囊和角化细胞中的角蛋白富含牢固的二硫键,不易被破坏,给 DNA 提取造成一定的困难。

在目前,以 DNA 序列为基础的物种鉴定方法尚存在许多争议,但大量的系统发育研究表明,线粒体 DNA 序列信息可有效用于指示物种发展和演化的历史,甚至在某些情况下还可用于对不同地区的物种群体进行界定^[7-8]。利用 mtDNA 鉴定燕窝的优势体现在:由于待检的药材样品通常经过加工和长时间存放,细胞中的核 DNA 已发生不同程度降解,但 mtDNA 的闭环结构以及线粒体双层膜的保护,使在同等条件下不易降解,因此从样品中提得 mtDNA 的机会较高。mtDNA 多态性分析在鸟类种群分类学和种群遗传学研究中较为成熟,选择 mtDNA 作为研究对象易于获得更多的技术支持。

本研究成功对实地采集的 25 份未进行任何加工的东南亚燕窝样品的 12S rRNA 和 *Cytb* 基因序列进行分析,这为解决燕窝来源物种身份鉴定的问题提供了一种崭新的手段。D-Loop 虽然是 mtDNA 分子中进化最快的区域,但由于测序和比对存在困难,因此使用较少,其余基因的变异程度从大到小依次为 12S rRNA>ND2>*Cytb*,其中 12S rRNA 更适合种内水平,而 *Cytb* 则在鸟类种间遗传差异研究中用得较多,这与本项目对燕窝研究的结果是一致的。

虽然以次充好的现象如此泛滥,可目前国内还没有对燕窝进行强制的认证和规范,市场上的燕窝食品执行的一般都是企业自己的标准,这也为某些狡猾的商家提供了可乘之机^[2,9-11]。

笔者认为,造成国内目前燕窝市场如此混乱的根源在于燕窝资源地主要在国外,国内的法律很难从源头监控、制止和打击燕窝造假的行为,为了从根本上解决以上问题,笔者建议:①对进口燕窝主产地的资源进行详细考察,明确不同地区生产燕窝的主要鸟种类型;②加强对进口燕窝市场渠道的调查研究,海关和各级检验部门建立标准的燕窝质量评价标准;③设计和筛选通用性适中的扩增引物,通用性过高容易扩增不必要的污染序列并干扰后续的分析过程,专一性太强的引物的适用范围有限,不利于该项技术的普及;④燕窝在采集、加工、运输和储藏过程中对提取的总 DNA 质量影响很大,在规范燕窝制备方法的前提下,有必要在单个反应中扩增出尽可能长的基因片段或同时对多个位点进行组合分析,这样对提高样品的检出率和实验结果的可靠性是有益的。

REFERENCES

- [1] 黎倩欣,陈思桦,李耿. 燕窝基原开发历史的研究[C]//第十九届全国药史本草学术研讨会暨 2017 年江苏省药学会药史专业委员会年会论文集. 苏州. 2017-10-13.
- [2] SHAO J H, DING Q, WANG S, et al. Research status of the edible bird's nest from southeast Asia [J]. J Food Safe Qual(食品安全质量检测学报), 2018, 9(5): 957-973.
- [3] 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.
- [4] CHEN Y J, LIU W J, CHEN D N, et al. A study on identification of edible bird's nests by DNA barcodes [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(23): 4593-4597.
- [5] 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: 259-266.
- [6] WANG L L, CHEN N, ZHANG W W, et al. Study on a collagenase protocol to extract DNA from remnant feathers in edible bird's nest [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2013, 36(8): 1224-1226.
- [7] CHEN N, LIU P, WANG L L, et al. Researches on the bio-active components in edible bird's nest [J]. Letters Biotechnol(生物技术通讯), 2013, 24(1): 143-146.
- [8] FANG J, LYU Q, CHEN Z, et al. Identification of commercially Available Rubi Fructus based on DNA barcoding technology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(4): 437-442.
- [9] LEE T H, WANI W A, KOAY Y S, et al. Recent advances in the identification and authentication methods of edible bird's nest [J]. Food Res Int, 2017, 100: 14-27.
- [10] 李姗姗. 印尼燕窝为何独得恩宠[J]. 中国商界, 2017(8): 118-121.
- [11] 郭军,周澎栋,陈娜. 进口燕窝选购需谨慎. 检验检疫支招消费者[J]. 广西质量监督导报, 2018, 23(3): 5-52.

收稿日期: 2019-07-21

(本文责编: 李艳芳)