

基于 ND2 基因序列的燕窝 DNA 条形码鉴别

王凤云^{1,2}, 蒋颖诗², 赖小平^{1*}

(1. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:利用 DNA 条形码鉴定技术,快速、准确地鉴别不同种类及产地的燕窝,为该药材的质量评价提供参考。
方法:提取不同产地及品种燕窝的 DNA,对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 2(ND2)部分序列进行扩增和测序,利用软件 MEGA6.0 进行序列比对,分析变异位点,计算 Kimura-2 参数遗传距离,构建邻接(neighbor-joining,NJ)系统发育树。
结果:NJ 系统发育树显示 31 个官燕窝样品均与爪哇金丝燕 *Aerodramus fuciphagus* 聚为 1 支;1 个毛燕窝样品与大金丝燕 *A. maximus* 聚为 1 支。但官燕窝中经细胞色素 b(Cytb)鉴定生物基原为爪哇金丝燕亚种(淡腰金丝燕 *A. fuciphagus germani*)的 8 个样品单独聚为 1 支,支持率 82%,并在该段 ND2 序列表现为 2 个位点的差异,表明该段 ND2 序列可鉴别爪哇金丝燕的亚种。
结论:ND2 条形码可用于快速、准确地鉴别燕窝的生物基原。

[关键词] 燕窝; DNA 条形码; NADH 脱氢酶亚单位 2; 基原鉴定

[中图分类号] R282.5;R284.2;R931.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0036-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150512.1117.005.html>

[网络出版时间] 2015-05-12 11:17

Molecular Identification of Edible Bird's Nest Based on ND2 DNA Barcode WANG Feng-yun^{1,2}, JIANG Ying-shi², LAI Xiao-ping^{1*} (1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. School of Traditional Chinese Materia, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To identify different origins and categories of commodity edible bird's nest (EBN) by DNA barcoding technique fastly and accurately. **Method:** Total genomic DNA was isolated from different origins and categories of commodity EBN. Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene sequences were amplified and sequenced. Identification were performed using similar Blast from GenBank, nearest distance and neighbor-joining (NJ) methods. **Result:** NJ phylogenetic tree showed 31 white or silver EBN samples which were clustered with *Aerodramus fuciphagus*; a black EBN sample was clustered with *A. maximus*. However, among white or silver EBN samples, there were 8 samples clustered into a separate branch with support rate of 82%, which were identified by cytochrome b (Cytb) gene as the subspecies (*A. fuciphagus germani*), and sequence alignment showed 2 parsimony-informative sites. This result showed that segment of ND2 sequence can identify subspecies of *A. fuciphagus*. **Conclusion:** ND2 sequence is efficient barcode for identifying origin species of EBN.

[Key words] edible bird's nest; DNA barcode; nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase subunit 2; genetic identification

燕窝是指雨燕科若干种金丝燕分泌唾液筑成的巢窝^[1],中医认为燕窝具有润肺滋阴、化痰止咳、益

气补中的功效^[2-3],用于治疗虚损、咳嗽,或用作食疗补品,滋补养胃^[4]。因燕窝属于昂贵珍稀之物,

[收稿日期] 20150122(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173498)

[第一作者] 王凤云,在读博士,讲师,从事中药资源开发与鉴定研究,Tel:15820220897,E-mail:wfyen2000@163.com

[通讯作者] *赖小平,博士,研究员,从事中药新药研究与开发,Tel:020-39358050,E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn

价位等级悬殊,利润丰厚,同时由于缺乏科学的鉴别标准,致使目前市场上品种质量参差不齐。为规范市场和合理开发使用,亟需对燕窝进行系统研究,建立一套科学有效的质量评价方法。

不同种类的燕窝是由不同物种的金丝燕所产,价格和质量差异巨大。在前期开展燕窝的品种调查^[5-7]、质量研究^[8-10]和药材鉴定^[11-12]的基础上,本实验收集了不同产地和品种的 31 种官燕窝和 1 种毛燕窝,前期已针对线粒体细胞色素 b (Cytb) 基因片段进行了基原鉴定和序列分析,发现这些样品中 23 个官燕窝为爪哇金丝燕 *Aerodramus fuciphagus*, 8 个为其亚种淡腰金丝燕 *A. fuciphagus germani*, 1 个毛燕窝的生物基原为大金丝燕 *A. maximus* 或其亚种 *A. maximus lowi*。为了探索不同种类和产地燕窝的基因差异,寻找更加快速、有效地鉴别燕窝种类的 DNA 片段,本实验尝试针对这些样品从其他线粒体基因进行探索分析。

在美国国立生物技术信息中心 (national center for biotechnology information, NCBI) 的 Nucleotide 数据库中搜索,发现关于金丝燕属鸟类的基因序列,除了 Cytb 外上传较多的数据是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 脱氢酶亚单位 2 (ND2) 基因。ND2 基因是线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的蛋白编码基因,是 NADH 脱氢酶的亚基,而 NADH 脱氢酶是呼吸链复合体 I 的主要组成,其在呼吸链中直接参与氧和电子传递并通过氧化磷酸化产生三磷酸腺苷 (ATP),进而参与能量代谢作用。由于本实验的研究对象为燕窝,并非金丝燕标本,为提高试验准确性,尽可能地选择与具有更多已知金丝燕的序列相结合进行研究,尝试在已通过 Cytb 基因鉴定了生物基原的基础上针对 ND2 基因进行分析。

1 材料

TG16MW 型台式高速离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司), TIM-20 型全自动雪花制冰机和 Tocan 240 型凝胶成像系统 (上海领成生物科技有限公司), BG-Power 300 型水平电泳仪 (北京白晶生物技术有限公司), LX-100 型手掌型离心机和 GL-88B 型涡旋振荡仪 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司), FA2204B 型 1/1 万分析天平 (上海精科天美科学仪器有限公司), 2720 Thermal Cycler 型聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。口腔/咽拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒 (批号 ZP321-01), DNA Marker II (100, 300, 500, 700, 900, 1 200 bp), 2 × Taq

PCR MasterMix, 蛋白酶 K, GoldView 核酸染料均购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司, 水为超纯水, 引物 (由北京六合华大基因科技股份有限公司合成), 其余试剂均为国产分析纯。

收集 32 个来自不同国家、不同形状、不同颜色的商品燕窝, 其中 1 个毛燕窝 (含大量羽毛) 和 31 个官燕窝 (不含或含少量羽毛), 官燕窝中 22 个为采自人工燕屋的屋燕, 9 个为采自天然岩洞的洞燕, 经 Cytb 基原鉴定其物种来源分别为爪哇金丝燕和淡腰金丝燕, 毛燕窝的生物基原为大金丝燕。均经广州中医药大学赖小平研究员鉴定, 凭证标本均密封保存于广州中医药大学。样品 40 °C 烘干, 按无菌操作研磨成 120 目细粉, -20 °C 保存备用。材料的详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 总 DNA 提取和 PCR 扩增、测序 称取燕窝样品 25 ~ 30 mg, 采用口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 参照试剂盒说明书步骤进行提取。ND2 序列扩增使用引物^[13] (5'-ATTCGAAAA TCCTGGCCTT-3') 和 (5'-CATTGGGGTTTTTGTTTC AGG-3')。PCR 反应缓冲液均采用 2 × premix Taq PCR 缓冲液。PCR 反应体系为 25 μL, 其中 premix Taq 12.5 μL, 2 个引物浓度均为 10 mmol · L⁻¹, 两个引物各 0.5 μL, 模板量 1.5 μL, 加水补足体积。循环参数为 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环。首次循环前 94 °C 变性 4 min, 最后一个循环后 72 °C 延伸 4 min。PCR 产物纯化后用测序仪进行双向测序。引物合成及测序均在华大基因公司完成。

2.2 数据处理 采用 DNASTar 软件包中的 Seqman 对测序所得的峰图进行校对拼接, 去除引物区和低质量的序列。利用相似性搜索法 (Blast)、最近距离法等对燕窝的物种进行鉴定分析。利用软件 MEGA6.0 中 Kimura-2 参数模型构建邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树, 利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

2.3 GenBank 相似序列 Blast 分析 将所得样品序列拼接校正后经 MEGA 软件对齐删减, 选取所有样品长度均为 124 bp 的一段 ND2 序列。32 个样品的最终序列输入 GenBank 中进行 Blast 搜索, 结果显示 1 ~ 31 号爪哇金丝燕和淡腰金丝燕所产的燕窝样品的最相似序列均为爪哇金丝燕 *Aerodramus fuciphagus*, 其中 23 个爪哇金丝燕燕窝样品的最高相似度 100%, 另 8 个淡腰金丝燕燕窝样品的最高

表 1 燕窝样品情况

Table 1 Conditions of edible bird's nest samples

No.	产地	类别 (生产环境)	类别 (颜色)	类别 (形状)	生物基原
1	印尼	屋燕	黄燕	角燕	爪哇金丝燕
2	印尼	屋燕	白燕	碗燕	爪哇金丝燕
3	印尼	屋燕	白燕	角燕	爪哇金丝燕
4	印尼	屋燕	白燕	碗燕	爪哇金丝燕
5	印尼	屋燕	白燕	碗燕	爪哇金丝燕
6	印尼	屋燕	白燕	角燕	爪哇金丝燕
7	印尼	屋燕	白燕	碗燕	爪哇金丝燕
8	印尼	屋燕	白燕	角燕	爪哇金丝燕
9	印尼	屋燕	黄燕	角燕	爪哇金丝燕
10	印尼	屋燕	血燕	燕条	爪哇金丝燕
11	马来西亚	洞燕	黄燕	角燕	淡腰金丝燕
12	马来西亚	屋燕	黄燕	角燕	爪哇金丝燕
13	马来西亚	屋燕	白燕	角燕	爪哇金丝燕
14	越南	洞燕	黄燕	燕条	爪哇金丝燕
15	越南	洞燕	黄燕	燕饼	爪哇金丝燕
16	越南	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
17	越南	洞燕	黄燕	燕盏	淡腰金丝燕
18	印尼	屋燕	白燕	燕块	爪哇金丝燕
19	泰国	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
20	印尼	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
21	越南	洞燕	白燕	燕盏	淡腰金丝燕
22	泰国	洞燕	黄燕	燕盏	淡腰金丝燕
23	泰国	洞燕	血燕	燕盏	淡腰金丝燕
24	印尼	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
25	越南	洞燕	白燕	燕盏	淡腰金丝燕
26	越南	洞燕	白燕	燕盏	淡腰金丝燕
27	印尼	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
28	泰国	洞燕	黄燕	燕盏	淡腰金丝燕
29	马来西亚	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
30	马来西亚	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
31	马来西亚	屋燕	白燕	燕盏	爪哇金丝燕
32	马来西亚	毛燕窝	黄燕	燕盏	大金丝燕

相似度 98%。32 号大金丝燕所产的毛燕窝样品的最相似序列为大金丝燕 *A. maximus*, 相似度 100%。期望值均为 0。经查询 GenBank 中上传的金丝燕属所有物种的 ND2 序列共有 221 个, 其中爪哇金丝燕 *A. fuciphagus* 191 个, 大金丝燕 *A. maximus* 5 个, 没有关于爪哇金丝燕和大金丝燕亚种的序列信息。

2.4 NJ 系统发育树 将燕窝样品与 GenBank 下载的 ND2 序列构建 NJ 系统发育树, 见图 1。结果显示 1~31 号样品均与爪哇金丝燕 *A. fuciphagus* 聚为一支, 支持率 62%; 其中 11, 17, 21, 22, 23, 25, 26, 28 号样品与其他样品又另分为 1 支, 支持率 82%。32 号样品与其他样品又另分为 1 支, 支持率 82%。32 号样品与所有大金丝燕 *A. maximus* 聚为一支, 支持率

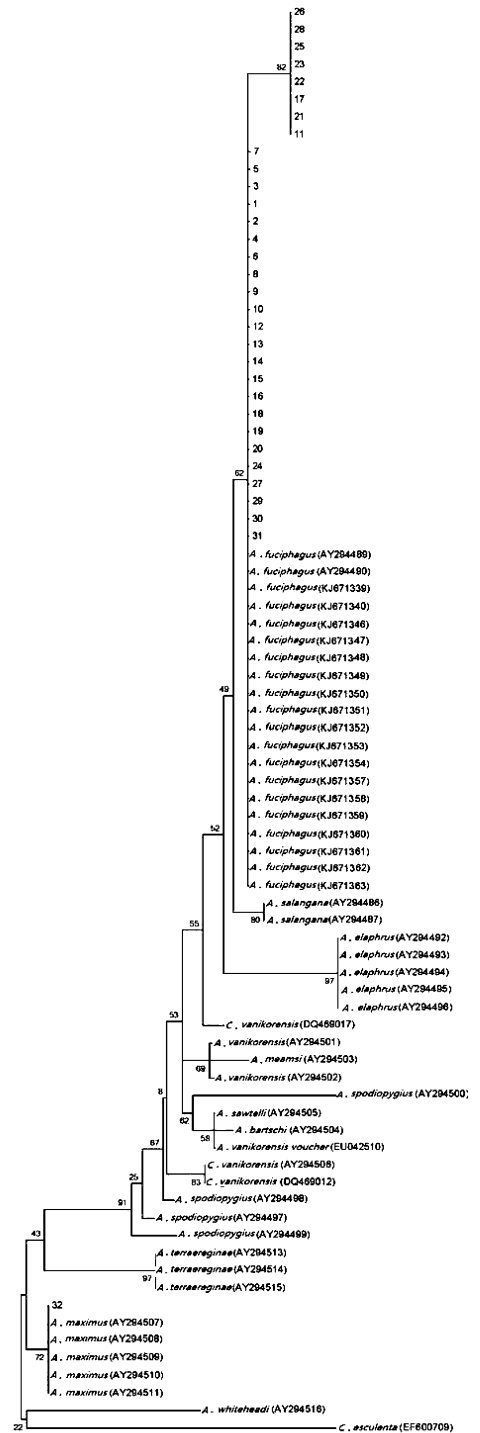


图 1 燕窝样品基于 ND2 序列的 NJ 系统发育树

Fig.1 NJ phylogenetic tree of edible bird's nest samples based on ND2 sequences

3 讨论

本文关于32种燕窝样品的生物基原鉴定结果和前期 Cytb 基因序列的鉴定结果一致,即官燕窝(1~31号样品)来自爪哇金丝燕 *A. fuciphagus* 或其亚种,毛燕窝(32号样品)来自 *A. maximus* 或其亚种。这也和文献报道相吻合^[14-15],更加证实了这一鉴定结果的正确性,也证实了从 ND2 基因鉴别燕窝基原物种的可行性。ND2 基因是 GenBank 中金丝燕属物种上传较多的序列,但数据库中信息量较 Cytb 基因少,而且其中没有关于爪哇金丝燕和大金丝燕亚种的序列信息,本文收集的样品中有8个官燕窝的生物基原是爪哇金丝燕的亚种淡腰金丝燕 *A. fuciphagus germani*,这些样品的 ND2 序列存在差异,且在 NJ 发育树有着较高的支持率。

结合前期实验结果和样品来源分析,从 Cytb 基因和 ND2 基因序列并未发现所收集燕窝样品中关于产地(不同国家)、颜色(白燕、黄燕、血燕)和形状上(碗燕、角燕、燕盏、燕碎等)的差异规律性,即不同颜色和形状的燕窝并无基原物种上的差异,只是实验发现样品中洞燕(产自天然岩洞)大多是来自亚种淡腰金丝燕 *A. fuciphagus germani*,而屋燕(产自人工燕屋)多是原种爪哇金丝燕 *A. fuciphagus*。本文所用的 ND2 条形码序列相比前期所用的 Cytb 序列长度更短,PCR 产物纯度更高,测序峰图质量极好,准确率接近 100%,提示该段序列对于鉴别燕窝的真伪具有更好的特异性,为燕窝种间的 DNA 序列多态性差异分析和寻找正品种群特有的核苷酸序列并制备成 DNA 探针提供参考。

[参考文献]

[1] Lim C K, Earl of Cranbrook. Swiftlets of Borneo[M].

Borneo; Natural History Publications, 2002; 9-12.

- [2] 林洁茹,周华,赖小平. 燕窝研究概述[J]. 中药材, 2006, 29(1): 85-90.
- [3] 赖小平,林洁茹,周华. 燕窝品种调查及质量研究[C]. 香港:两岸四地中药质量标准化研讨会论文集, 2005.
- [4] 赖小平,林洁茹,周华,等. Edible bird's nest's investigation, quality and origination research[C]. 旧金山:美中第三届国际中医药学术研讨会, 2009.
- [5] 林洁茹,周华,赖小平. 体视镜在燕窝鉴别中的应用[J]. 中药材, 2006, 29(3): 219-221.
- [6] 林洁茹,董燕,周华,等. 燕窝鉴别中的蛋白质电泳研究[J]. 世界科学技术——中药现代化研究, 2006, 8(3): 30-32.
- [7] 王慧,倪坤仪,王玉. 燕窝中唾液酸的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1251-1253.
- [8] Lin J R, Zhou H, Lai X P, et al. Genetic identification of edible bird's nest based on mitochondrial DNA sequences[J]. Food Res Int, 2009, 42(8): 1053-1061.
- [9] 林洁茹,周华,赖小平,等. 燕窝 DNA 提取方法研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2010, 12(2): 202-210.
- [10] Wu Y J, Chen Y, Wang B, et al. Application of SYBRgreen PCR and 2DGE methods to authenticate edible bird's nest food[J]. Food Res Int, 2010, 43(8): 2020-2026.
- [11] Lee P L, Clayton D H, Griffiths R, et al. Does behavior reflect phylogeny in swiftlets (Aves: Apodidae)? A test using cytochrome b mitochondrial DNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(14): 7091-7096.
- [12] 林洁茹. 燕窝 DNA 基原鉴定及抗病毒作用研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2010.

[责任编辑 刘德文]