

# 多重 RT-PCR 法检测燕窝及其制品掺伪成分

陈筱婷\*

(福建省产品质量检验研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(福州), 福州 350000)

**摘要: 目的** 建立一种食用燕窝中主成分及掺伪成分的双重和三重实时荧光 PCR 检测方法。**方法** 本研究通过合成金丝燕成分、银耳成分、红藻成分特异性的引物和探针, 建立燕窝中主成分及掺伪成分的双重和三重实时荧光 PCR 检测体系, 并设计相应的特异性实验保证检测体系的准确性, 最后使用所建立的方法对市售样品进行检测并收集数据, 验证多重实时荧光 PCR 检测方法的适用性。**结果** 本方法可在 1 d 内完成样品的检测, 建立的体系对金丝燕成分、银耳成分的检测灵敏度为 0.1 ng/ $\mu$ L, 红藻成分的检测灵敏度为 0.5 ng/ $\mu$ L; 燕窝中掺入银耳的检测限可达到 0.1%; 燕窝中掺入石花菜的检测限可达到 0.5%。**结论** 本研究建立的多重实时荧光 PCR 检测方法具有准确、灵敏度高、特异性好的优点, 可用于燕窝及其制品中掺假物成分的准确性检测。

**关键词:** 燕窝及制品; 掺伪成分; 多重实时荧光 PCR

## Determination of adulterated components in edible bird's nests and their products by multiplex RT-PCR

CHEN Xiao-Ting\*

(Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fuzhou 350000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of principal components and adulterated components in edible bird's nests by multiplex real-time PCR. **Methods** According to the highly conserved gene sequences, the specific primers and taqman probes were designed. Meanwhile, the stable duplex and triplex RT-PCR system were established for the detection of swiftlet, white fungus and red alga ingredients, and introduced into the specific test to guarantee the accuracy. Finally, the established method was used to detect the market samples and collect the data, and the applicability of multiple real-time fluorescence PCR detection methods would be verified to be feasible. **Results** The method could complete the detection of the sample in one day. The limits of detection of this system for DNA quality of swiftlet and white fungus components were respectively 0.1 ng/ $\mu$ L, and the limit of detection for the red alga ingredient was 0.5 ng/ $\mu$ L. The volume adulterated limit of detection for white fungus in swiftlet was 0.1% (V/V) in mixtures; and the limit of detection for red alga milk in swiftlet was 0.5% (V/V) in mixtures. **Conclusion** This multiplex real-time PCR assay has the advantages of accuracy, high sensitivity and good specificity, which is suitable for determination of principal components and adulterated components in edible bird's

基金项目: 福建省产品质量检验研究院科技项目(闽检科[2018]81号)(KY201819A)

Fund: Supported by the Fujian Provincial Product Quality Inspection Institute Science and Technology Project (Medical Inspection Department [2018] No.81) (KY201819A)

\*通讯作者: 陈筱婷, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: lizzy712@163.com

\*Corresponding author: CHEN Xiao-Ting, Master, Engineer, Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fuzhou 350000, China. E-mail: lizzy712@163.com

nests and their products.

**KEY WORDS:** edible bird's nest; adulteration ingredients; multiplex real-time PCR

## 1 引言

燕窝是由金丝燕及多种同属燕类用唾液与绒羽等混合凝结所筑成的巢窝,主产于马来西亚、印度尼西亚、菲律宾、越南等东南亚国家和地区,自古以来一直被视为一种名贵中药和珍稀食品<sup>[1]</sup>。近年来,因消费需求的逐渐增加,加上燕窝的产量有限,燕窝的价格也在逐渐攀升。但由于缺乏统一的质量分级、产品认证和溯源管理体系,致使燕窝中的掺假掺杂、以次充好、产品无标识、产品标识不清等不良商业现象普遍存在,市场中燕窝的质量安全现状令人担忧<sup>[2]</sup>。

目前燕窝真伪鉴别方法主要有理化检测、色谱光谱检测、分子生物学检测等,其中分子生物学检测包括凝胶电泳技术、普通 PCR、实时荧光定量 PCR、DNA 指纹技术和基因芯片技术<sup>[3]</sup>。分子生物学是从基因水平对燕窝中的金丝燕及掺假物种成分进行鉴定,与常规检测方法相比,其具有特异性强、灵敏度高、有效降低污染率、连续快速、自动化程度高等特点,目前已得到广泛应用。但目前运用多重实时荧光 PCR 检测方法对燕窝及其制品进行真伪鉴定的报道很少。本研究拟采用基于 Taqman 多重实时荧光 PCR 方法对燕窝及其制品中掺伪成分进行鉴别和检测,针对常见的掺伪成分如银耳、琼脂等,设计特异性强的双重或三重引物与探针,建立主成分金丝燕基因,以及常见掺伪成分如银耳基因、红藻基因的双重或三重实时荧光 PCR 检测方法,形成高灵敏度、高特异性和高通量的燕窝及其制品掺伪成分的快速检测技术。所建立的应用于燕窝及其制品的掺假掺伪鉴定的基因组学检测技术,可应用于其他名贵保健食品和名贵中药材,如冬虫夏草、灵芝、红菇、人参、鹿茸、鱼翅等产品的真伪检测,弥补市场对于名贵保健品、名贵中药材检测技术的缺口和需求,为市场、生产企业和监管部门提供精准、快速、高效率高通量的基因组学检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料、试剂与仪器

#### 2.1.1 实验材料

纯燕窝标准品、石花菜藻状体由某中医药大学实验室提供,放置于 0~5 °C 保存备用;银耳购自大超市,以上样本用于阳性对照品的制备。

紫菜、黑木耳、猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鸭肉、鹅肉、大米、马铃薯、玉米、大麦、小麦、大黄花鱼和鲑鱼样本均购自大中型超市,以上样本用于引物和探针特异性

的检测。

9 份固体燕窝样品,包括干燕盏、干燕条、干燕碎,分别来源于印尼、马来西亚进口产品;30 份即食、即冲、羹类燕窝制品,包括即食冰糖燕窝、即冲燕窝以及燕窝银耳羹类产品等均购自于燕窝制品专卖店,以上样本用于市售样品的应用检测。

#### 2.1.2 试剂

10×PCR 缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、dNTP 溶液、Taq DNA 聚合酶、蛋白酶 K(生工生物工程(上海)股份有限公司);TIANGEN 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型,北京天根生化科技有限公司);植物组织 DNA 提取试剂盒、植物种子 DNA 提取试剂盒(宁波市重鼎生物技术有限公司);无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

#### 2.1.3 实验仪器

7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Hfsafe1200 生物安全柜(上海力申公司);SmartSpec plus 2100 pro 核酸蛋白分析仪(美国 Bio-Rad 公司);Minispin 台式离心机(德国 Eppendorf 公司);B-3D 热块加热器(英国 TECHNE 公司);HTY-761 匀浆仪(浙江泰林生物技术股份有限公司)。

## 2.2 方法

### 2.2.1 样本制备

纯燕窝标准品、干燕盏、干燕条、干燕碎用镊子去除羽毛和杂质后用匀浆仪粉碎成粉末状;猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鸭肉、玉米、大黄花鱼和鲑鱼等样品在处理前清洗干净,银耳、黑木耳、石花菜、紫菜放置于 60 °C 烘箱中烘至干燥用匀浆仪磨碎后备用。在样本制备过程应防止交叉污染。

### 2.2.2 DNA 提取

除石花菜、即食、羹类燕窝制品样本外,纯燕窝、燕盏、燕条、燕碎、即冲燕窝、油炸猪皮、鸡肉、牛肉、羊肉、鸭肉、大黄花鱼、鲑鱼样本按照细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行 DNA 提取;银耳、黑木耳、紫菜、大米、马铃薯、玉米、大麦、小麦样本按植物组织 DNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行 DNA 提取。

称取石花菜样本 200 mg 至 2 mL 离心管中,加入试剂盒自备裂解液和蛋白酶 K 后,经过 56 °C 孵育 3 h,离心后转移上清液至新离心管中,加入 0.8 倍体积的氯仿,混匀离心。后续步骤按照细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。

称取即食、羹类燕窝制品样本 10 g 至 50 mL 离心管中,加入 20 mL 超纯水混合均匀,离心后去除上清液,取得固形物。重复上面步骤 2 次,将所得固形物于 60 °C 烘箱

中烘 30 min。后续 DNA 提取步骤同石化菜样本。

使用核酸蛋白分析仪测定以上样本的 DNA 浓度和纯度, 选择 DNA 浓度 100 ng/ $\mu$ L 左右(石花菜、即食燕窝、即冲燕窝、羹类燕窝制品样本 DNA 浓度为 50 ng/ $\mu$ L 左右)、OD260/OD280 值为 1.6~2.0 之间的 DNA 样本备用。

### 2.2.3 引物探针的设计

根据物种特异性基因片段设计相应的 RT-PCR 引物与探针, 引物和探针序列见表 1, 引物与探针委托上海生物工程技术有限公司合成。

### 2.2.4 实时荧光 PCR 检测体系

实时荧光 PCR 体系反应体系为 10 $\times$ PCR 缓冲液, 5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub>, 4  $\mu$ L; dNTP, 1  $\mu$ L; 上、下游引物各 1.5  $\mu$ L, 荧光标记探针 1  $\mu$ L, 终浓度均为 10  $\mu$ mol/L; Taq DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L; DNA 模板(100 ng/ $\mu$ L)2  $\mu$ L; 用灭菌双蒸水将体积补至 50  $\mu$ L。实时荧光 PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}$ C, 3 min; 95  $^{\circ}$ C, 15 s; 58  $^{\circ}$ C, 1 min, 45 个循环。

### 2.2.5 实时荧光 PCR 特异性检测

实时荧光 PCR 反应特异性实验设计见表 2, 阳性对照组和阴性对照组所使用的 DNA 样本来源, 在表 2 的备注中进行详细的说明。

### 2.2.6 实时荧光 PCR 绝对灵敏度检测

为检测合成的金丝燕源性成分、银耳源性成分、红枣源性成分引物和探针的灵敏度, 将纯燕窝标准品、银耳、石花菜的 DNA 样本分别用无菌双蒸水进行稀释, 稀释浓度从高到低分别为: 100、10、1、0.1、0.01 ng/ $\mu$ L。将稀释好的 DNA 样本各取 1  $\mu$ L 进行实时荧光 PCR 扩增实验, 用以实时荧光 PCR 绝对灵敏度的检测。

### 2.2.7 实时荧光 PCR 相对灵敏度检测

将纯燕窝标准品、银耳和石花菜制备成不同浓度梯度的模拟样品, 其中, 以纯燕窝标准品为研究对象, 以银耳粉末作为样品基质, 分别依次配制成含有 20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1% 纯燕窝成分的银耳粉末样品, 提取 DNA 后进行实时荧光 PCR 扩增。以掺假物银耳、石花菜作为研究对象, 以燕窝粉末作为样品基质, 分别依次将掺假物与燕窝配制成含有 20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1% 掺假物成分的燕窝粉末样品, 并提取不同比例混合模拟样品 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增反应。

### 2.2.8 市售燕窝制品检测分析

为进一步验证多重实时荧光 PCR 体系的准确性和市场适用性, 收集市场常见的燕窝制品一共 39 份, 包括 9 份固体燕窝样品, 如干燕盏、干燕条、干燕碎; 30 份即炖和即食燕窝制品, 如即食冰糖燕窝、即冲燕窝、燕窝银耳羹等, 提取相应的样品 DNA 进行实时荧光 PCR 反应, 检验所建立的实时荧光多重 PCR 检测方法的实用性和可靠性。

## 3 结果与分析

### 3.1 特异性检测结果

金丝燕-银耳成分实时荧光 PCR 检测结果如图 1 所示, 在 45 个反应循环内, 纯燕窝和银耳的 DNA 样本都有特异性的扩增曲线, Ct 值分别为 24.02、15.39, Ct 值均小于 35, 而黑木耳、动物源性、植物源性样本均无扩增曲线, 说明该引物探针特异性强, 适用于金丝燕和银耳成分双重实时荧光 PCR 检测。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of the primers and probes

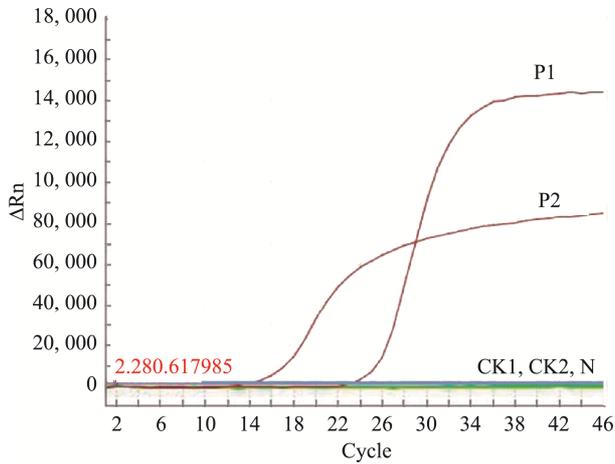
检测物种	引物与探针序列(5'-3')
金丝燕源性成分 (线粒体细胞色素 b)	CAGTAGACAACCCACATTA TGGAGGAAGGTGAGGTGRAT JOE -CCTAATCGCAGGCCTCACCTC-TAMRA
银耳源性成分 ( $\alpha$ 微管蛋白)	GGATCAATGCTCTGGACTTC AGCCAGATCCAGTGCCGC ROX- CGCCGAAAAGAGTGGAAGACAAAGAAGCC-MGB
红藻源性成分 (藻红蛋白)	AGAGTATGCTCTGCTATTAG CCTTGTACAGATTCAGATC FAM-TGGAAAACGTCCAGCAGCRTACGCTGC-TAMRA

表 2 实时荧光 PCR 反应特异性实验设计

Table 2 The experimental design of specificity tests for RT-PCR

检测体系	阳性对照组	阴性对照组
金丝燕-银耳源性成分	纯燕窝标准品 DNA、银耳 DNA	黑木耳 DNA、动物源性 DNA、植物源性 DNA
金丝燕-红藻源性成分	纯燕窝标准品 DNA、石花菜 DNA	紫菜 DNA、动物源性 DNA、植物源性 DNA
金丝燕-银耳-红藻源性成分	纯燕窝标准品 DNA、银耳 DNA、石花菜 DNA	黑木耳 DNA、紫菜 DNA、动物源性 DNA、植物源性 DNA

注: 动物源性 DNA 来自于猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉、鸭肉、鹅肉、大黄花鱼和鳕鱼样本; 植物源性 DNA 来自于大米、马铃薯、玉米、大麦、小麦。

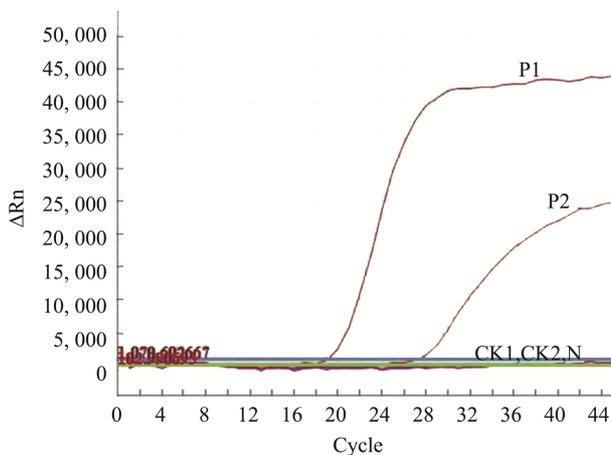


注: P1 为纯燕窝样本 DNA; P2 为银耳样本 DNA; CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

图 1 金丝燕-银耳成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.1 Specific test result of swiftlet-white fungus ingredients with duplex RT-PCR

金丝燕-红藻源性成分实时荧光 PCR 检测结果如图 2 所示, 在 45 个反应循环内, 燕窝和石花菜的 DNA 样本都有特异性的扩增曲线, Ct 值分别为 19.42、27.94, Ct 值均小于 35, 而紫菜、动物源性、植物源性样本均无扩增曲线, 说明该引物探针特异性强, 适用于金丝燕和红藻成分双重实时荧光 PCR 检测。



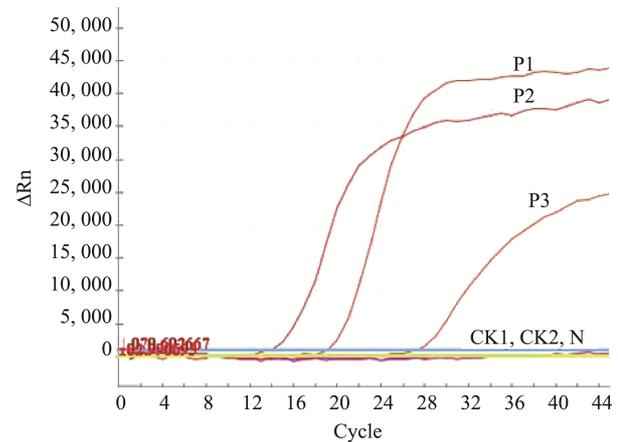
注: P1 为纯燕窝样本 DNA; P2 为石花菜样本 DNA; CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

图 2 金丝燕-红藻源性成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.2 Specific test result of swiftlet-red algae ingredients with duplex RT-PCR

金丝燕-银耳-红藻源性成分实时荧光 PCR 检测结果如图 3 所示, 在 45 个反应循环内, 燕窝、银耳和石花菜的 DNA 样本都有特异性的扩增曲线, Ct 值分别为 19.28、14.20、27.87, Ct 值均小于 35, 而黑木耳、紫菜、动物源性、植物源性样本无扩增曲线, 说明该引物探针特异性强,

适用于金丝燕、银耳、红藻成分三重实时荧光 PCR 检测。



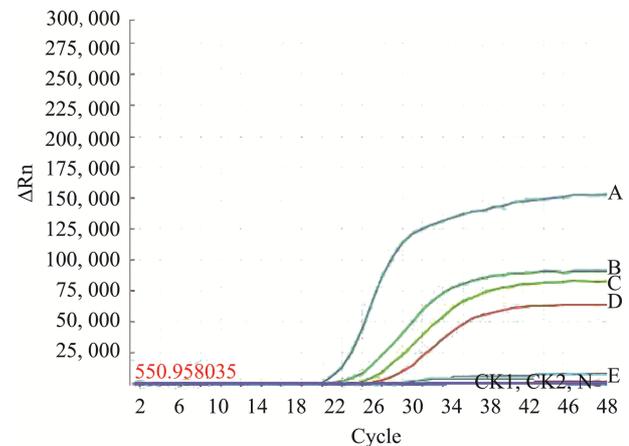
注: P1 为纯燕窝样本 DNA; P2 为银耳样本 DNA; P3 为石花菜样本 DNA; CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

图 3 金丝燕-银耳-红藻源性成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.3 Test result of swiftlet-white fungus-red algae ingredients with triplex RT-PCR

### 3.2 绝对灵敏度检测结果

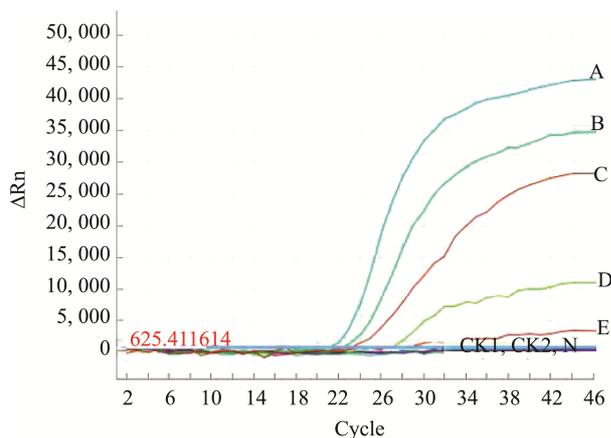
金丝燕、银耳、红藻源性成分灵敏度检测结果如图 4、图 5、图 6 所示, 空白对照均未出现扩增, 表明 PCR 反应体系未出现污染; 当燕窝、银耳的 DNA 浓度在 100~0.1 ng/μL 时均出现阳性扩增曲线, 且 Ct 值由小到大, 而 DNA 浓度在 0.01 ng/μL 时均无扩增, 说明所建立的体系对燕窝、银耳成分 DNA 溶液的检测下限为 0.1 ng/μL。当石花菜的 DNA 浓度在 100~0.5 ng/μL 时均出现阳性扩增取现, 且 Ct 值由小到大, 而 DNA 浓度在 0.1 ng/μL 时无扩增, 说明所建立的体系对红藻成分 DNA 溶液的检测下限为 0.5 ng/μL。



注: A: 100 ng/μL; B: 10 ng/μL; C: 1 ng/μL; D: 0.1 ng/μL; E: 0.01 ng/μL; CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

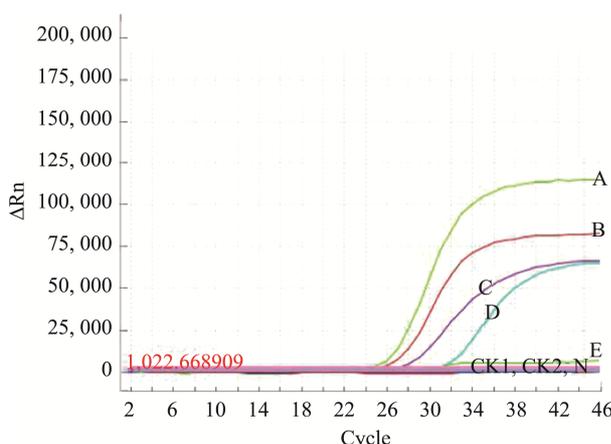
图 4 金丝燕成分绝对灵敏度实时荧光 PCR 检测结果

Fig.4 Absolute sensitivity test result of the swiftlet ingredient with real-time fluorescence PCR



注: A: 100 ng/μL; B: 10 ng/μL; C: 1 ng/μL; D: 0.1 ng/μL; E: 0.01 ng/μL  
CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

图 5 银耳成分绝对灵敏度实时荧光 PCR 检测结果  
Fig.5 Absolute sensitivity test result of the white fungus ingredient with real-time fluorescence PCR



注: A: 100 ng/μL; B: 10 ng/μL; C: 1 ng/μL; D: 0.1 ng/μL; E: 0.01 ng/μL;  
CK1, CK2, N 分别代表样品提取空白对照、体系空白对照、阴性对照。

图 6 红藻成分绝对灵敏度实时荧光 PCR 检测结果  
Fig.6 Absolute sensitivity test result of the red algae ingredient with real-time fluorescence PCR

### 3.3 相对灵敏度检测结果

由图 7 金丝燕成分相对灵敏度检测结果显示, 随着燕窝含量占比的降低, 其 Ct 值逐渐升高, 含量占比(w/w)分别为 20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%, Ct 值均小于 35, 有特异性的扩增曲线, 说明本研究所建立的实时荧光 PCR 检测体系可检测到比例为 0.1%的金丝燕成分。

由图 8 银耳成分相对灵敏度检测结果显示, 随着银耳含量占比的降低, 其 Ct 值逐渐升高, 含量占比(w/w)分别为 20%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%, Ct 值均小于 35, 有特异性的扩增曲线, 说明本研究所建立的实时荧光 PCR 检测体系可检测到比例为 0.1%的银耳成分。

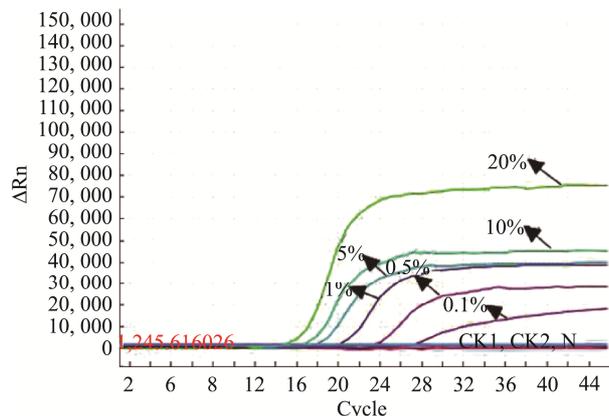


图 7 金丝燕成分相对灵敏度结果  
Fig.7 Relative sensitivity analysis of the swiftlet ingredient

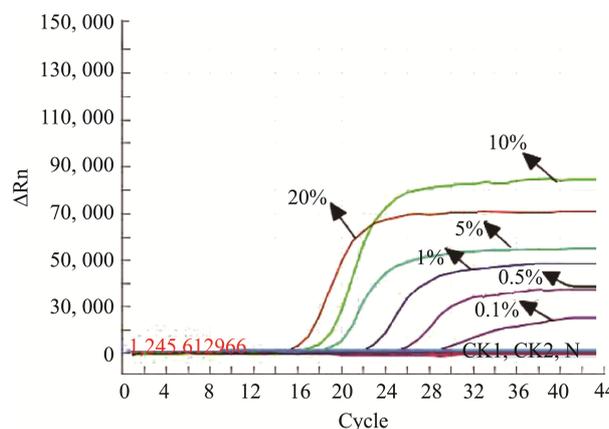


图 8 银耳成分相对灵敏度检测结果  
Fig.8 Relative sensitivity analysis of the white fungus ingredient

通过图 9 红藻成分相对灵敏度检测结果可知, 随着石花菜含量占比的降低, 其 Ct 值逐渐升高, 含量占比(w/w)分别为 20%、10%、5%、1%、0.5%, Ct 值均小于 35, 有特异性的扩增曲线, 说明本研究所建立的实时荧光 PCR 检测体系可检测到比例为 0.5%的石红藻成分。

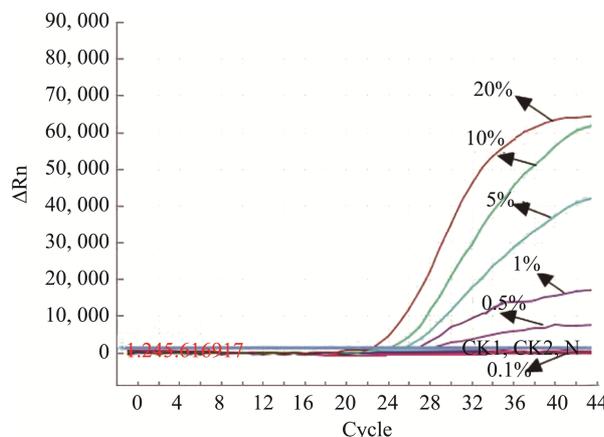


图 9 红藻成分相对灵敏度检测结果  
Fig.9 Relative sensitivity analysis of the red algae ingredient

### 3.4 市售燕窝制品检测分析

对收集的 39 份不同产品类别的燕窝及其制品进行检测能力应用验证, 市售燕窝制品检测结果见表 3。其中干燕盏、干燕条、干燕碎、即食燕窝、即冲燕窝、燕窝银耳羹分别使用金丝燕、银耳、红藻源性引物探针进行单重实时荧光 PCR 检测。

以上市售样品检测结果表明, 干燕盏、干燕条、干燕

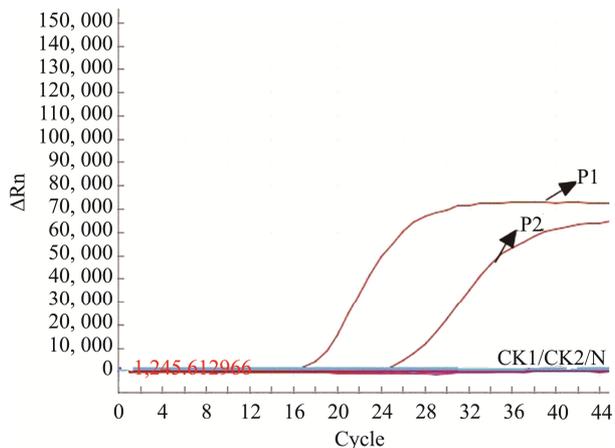
碎的检测结果与主成分相符, 5 份鲜炖燕窝检测结果与标识主成分也相符, 而即食燕窝中有 3 份检出红藻源性成分, 即冲燕窝中有 2 份检出红藻源性成分, 另外鲜炖燕窝银耳羹检出金丝燕成分和银耳成分, 分别选取即食燕窝、即冲燕窝和鲜炖燕窝银耳羹各 1 份样品用已建立的双重实时荧光 PCR 方法进行重复验证, 结果如图 10~12 所示。

表 3 市售燕窝制品检测结果

Table 3 The test results of market edible bird's nest samples

样品名称	样品份数	标签主成分	金丝燕源性检测结果	银耳源性检测结果	红藻源性检测结果
干燕盏	3	/	3 份均为阳性	3 份均为阴性	3 份均为阴性
干燕条	3	/	3 份均为阳性	3 份均为阴性	3 份均为阴性
干燕碎	3	/	3 份均为阳性	3 份均为阴性	3 份均为阴性
即食燕窝	20	燕窝、冰糖、水	20 份均为阳性	20 份均为阴性	3 份为阳性, 其余为阴性
即冲燕窝	5	燕窝	5 份均为阳性	5 份均为阴性	2 份为阳性, 其余均为阴性
冻干燕窝银耳羹	5	银耳、冰糖、燕窝	5 份均为阳性	5 份均为阳性	5 份均为阴性

注: “阳性”为检出该源性成分; “阴性”为未检出该源性成分。



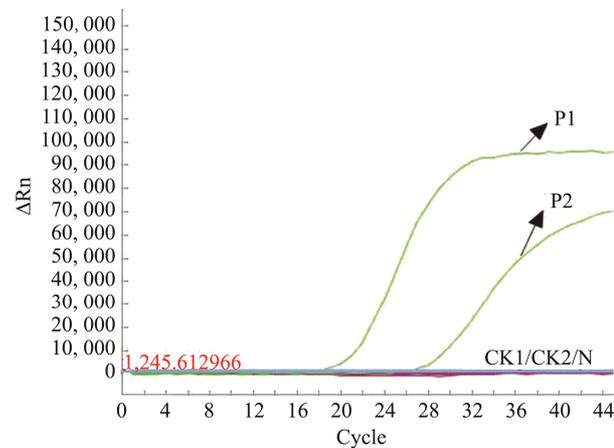
注: P1 指示在即食燕窝中检测出金丝燕成分; P2 指示在即食燕窝中检测出红藻成分;

CK1 为提取空白对照; CK2 为体系空白对照; N 为阴性对照。

图 10 即食燕窝样本双重实时荧光 PCR 检测结果

Fig.10 The test result of market edible bird's nest sample

经过多重实时荧光 PCR 的重复验证证明, 一部分即食燕窝和即冲燕窝检出了金丝燕成分, 燕窝银耳羹检出了金丝燕成分、银耳成分和红藻成分, 而通过样品标签标识可知, 产品标签并未注明相应的红藻成分及其含量, 容易引起误导消费者的嫌疑。但目前本课题未研究出检测燕窝制品中金丝燕源性成分的含量相关的方法。因此在未来的研究中亟待开发出可以确定燕窝制品中燕窝标志性成分的含量的检测方法, 为制定相关的燕窝真伪鉴定及含量检测标准奠定一定的研究基础。



注: P1 指示在即冲燕窝中检测出金丝燕成分; P2 指示在即冲燕窝中检测出红藻成分;

CK1 为提取空白对照; CK2 为体系空白对照; N 为阴性对照。

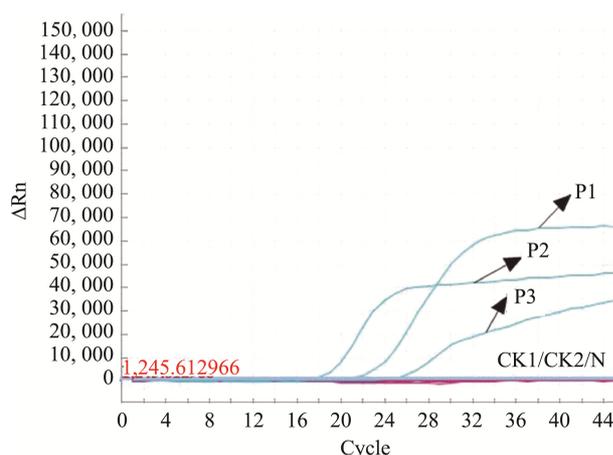
图 11 即冲燕窝样本双重实时荧光 PCR 检测结果

Fig.11 The test result of market edible bird's nest sample

## 4 讨论与结论

目前国内外用于燕窝及其制品真伪鉴别的检测方法主要有感官和普通理化检测、液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱、拉曼光谱技术、红外光谱技术、核磁共振技术、气相色谱-质谱技术和分子生物技术等<sup>[4]</sup>。林洁茹等<sup>[5]</sup>利用体视镜观察燕盏、燕碎和银耳涂胶, 根据燕窝的表面纹理鉴别出燕窝、涂胶燕窝或银耳, 该方法适用于大量商品进行初期筛查; 林丹等<sup>[6]</sup>采用氨基酸自动分析技术测定白燕窝的氨基酸组成, 建立白燕窝的氨基酸指纹图谱, 可作为

白燕窝识别的特征性指标; 侯真真等<sup>[7]</sup>通过使用电感耦合等离子体质谱仪测定燕窝中的 14 种元素含量的含量, 建立综合评价模型, 实现燕窝的真假鉴别和掺假种类鉴别; 赖心田等<sup>[8]</sup>利用竞争酶联免疫检测方法对燕窝特征蛋白-燕窝唾液酸糖蛋白的含量进行测定, 实现燕窝中目标蛋白质含量的定量分析; 郭丽丽<sup>[9]</sup>通过比较燕窝及其四种常见掺假物质的红外光谱, 结果表明 4 种掺假物质与燕窝的红外光谱明显不同, 为红外光谱在燕窝真伪鉴别中的应用性提供了理论基础; 于海花<sup>[10]</sup>采用液相色谱四级杆飞行时间串联质谱技术结合化学计量学方法建立一种燕窝真伪鉴定方法, 通过主成分分析建立燕窝鉴定模型, 该鉴定模型对参与模型建立的样品判定正确率为 100%, 对未参与模型建立的样本判定正确率为 99%, 样品的掺伪程度与判定结果的得分值呈负相关趋势, 可实现燕窝真伪信息的识别。



注: P1 指示在燕窝银耳羹中检测出金丝燕成分; P2 指示在燕窝银耳羹中检测出银耳成分;  
P3 指示在燕窝银耳羹中检测出红藻成分; CK1 为提取空白对照;  
CK2 为体系空白对照; N 为阴性对照。

图 12 燕窝银耳羹样本三重实时荧光 PCR 检测结果

Fig.12 The test result of market edible bird's nest sample

目前应用分子生物学技术鉴别燕窝真伪的研究也非常热门, Lin 等<sup>[11]</sup>利用燕窝线粒体细胞色素 b 基因序列设计了相应的引物, 并进行 PCR 的扩增、测序和序列比对, 通过聚类分析发现该方法能将燕窝来源进行区分, 可用于燕窝产地溯源鉴定; 何国林等<sup>[12]</sup>通过合成特异靶向的引物和探针, 建立 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法可检测痕量的燕窝样品; 王凤云等<sup>[13]</sup>使用 DNA 条形码技术对 32 种不同产地与品种的商品燕窝进行 DNA 基源鉴定, 揭示了不同产品和品种的商品燕窝基源物种的差异。Wua 等<sup>[14]</sup>运用 SYBR Green 荧光 PCR 快速检测燕窝制品中燕窝成分, 可将掺有 0.5% 银耳燕窝混合物检测出来。但目前还未有将多重实时荧光 PCR 技术应用于燕窝及其制品真伪鉴别的研究。本研究通过优化燕窝制品及其掺伪物质的 DNA 提取

方法, 针对燕窝制品及掺伪物质蛋白含量高的特点, 在提取过程中加入氯仿能很好地去除蛋白质的干扰, 提高目的 DNA 的纯度; 对于冰糖燕窝和碗燕等液体状态样品, 在前处理过程中利用多次富集固形物的方法, 提高目标 DNA 的浓度, 有利于后续扩增的顺利进行。另外, 本研究创新性应用多重实时荧光 PCR 检测技术, 通过合成金丝燕源性、银耳源性、红藻源性成分特异性的引物和探针, 设计互不干扰的发光基团, 摸索和优化反应体系和反应程序, 建立燕窝主成分及掺伪成分的双重和三重实时荧光 PCR 检测体系。并通过引物探针特异性、灵敏度以及模拟混合样品的检出限实验, 确定燕窝、银耳成分 DNA 溶液的检测下限为 0.1 ng/μL, 红藻成分 DNA 溶液的检测下限为 0.5 ng/μL; 金丝燕成分和银耳成分的相对灵敏度为 0.1%; 红藻成分相对灵敏度为 0.5%。本研究所建立的燕窝及其制品掺伪成分多重实时荧光 PCR 方法具有检测速度快、准确性高、特异性好、灵敏度高等优点, 经实际市售燕窝及其制品的检测验证了其可行性和适用性, 为实现燕窝及其制品中掺假掺杂成分的快速检测提供一定的研究技术基础。

#### 参考文献

- [1] 王羚邴, 黄松, 蒋东旭, 等. 燕窝的鉴别和药理研究进展[J]. 中医药现代化, 2013, (15): 146-150.  
Wu LL, Huang S, Jiang DX, *et al.* Identification and pharmacological progress on cubilose [J]. Mod Tradit Chin Med Mater-World Sci Technol, 2013, (15): 146-150.
- [2] 何艳青, 张俊红. 燕窝多种鉴别及质量检测技术的分析与总结[J]. 中国实用医药, 2011, (19): 241-242.  
He YQ, Zhang JH. Analysis and summary of bird's nest identification and quality detection technology [J]. China Prac Med, 2011, (19): 241-242.
- [3] 徐敦明, 范群艳, 施能文, 等. 燕窝的研究[M]. 北京: 中国质检出版社, 2017.  
Xu DM, Fan QY, Shi NW, *et al.* Research on bird's nest [M]. Beijing: China Quality and Standards Publishers, 2017.
- [4] 乌日罕, 陈颖, 吴亚君, 等. 燕窝真伪鉴别方法及国内外研究进展[J]. 检验检疫科学, 2007, (4): 60-62.  
Wu RH, Chen Y, Wu YJ, *et al.* Identification methods of bird's nest and research progress at domestic and abroad [J]. Inspect Quarant Sci, 2007, (4): 60-62.
- [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, (3): 219-221.  
Lin JR, Zhou H, Lai XP. Application of stereoscopy on edible bird's nest identification [J]. Inspect Quarant Sci, 2006, (3): 219-221.
- [6] 林丹, 庄俊钰, 黄永连, 等. 白燕窝的氨基酸指纹图谱构建及识别研究[J]. 食品工业, 2015, 36(7): 269-273.  
Lin D, Zhuang JY, Huang YL, *et al.* Establishment of amino acid composition fingerprint and identification of edible bird's nest [J]. Food Ind, 2015, 36(7): 269-273.
- [7] 侯真真, 庄俊钰, 冯志强, 等. 掺假燕窝的元素组成分析及鉴别研究[J]. 食品工业, 2016, 37(7): 287-291.  
Hou ZZ, Zhuang JY, Feng ZQ, *et al.* Analysis of elemental composition

- and identification of the bird's nest [J]. *Food Ind*, 2016, 37(7): 287–291.
- [8] 赖心田, 张世伟, 陈血建, 等. 酶联免疫法定量检测市售燕窝及其加工制品中特征蛋白含量[J]. *农产品加工*, 2013, (9): 4–12.
- Lai XT, Zhang SW, Chen XJ, *et al.* Enzyme linked immunosorbent assay for sialoglycoprotein in commercially available edible bird's nest and its products [J]. *Acad Period Farm Prod Process*, 2013, (9): 4–12.
- [9] 郭丽丽. 表征属性识别技术在燕窝真伪鉴别中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- Guo LL. Study on the application of representative characteristics recognition technology in authentication of edible bird's nest [D]. Beijing: China Agriculture University, 2014.
- [10] 于海花. 基于 LC/Q/TOF 和拉曼技术的燕窝甄别方法研究[D]. 福建: 集美大学, 2015.
- Yu HH. The studies on identification method for authenticity of edible bird's nest based on LC/Q/TOF and raman spectroscopy [D]. Fujian: Jimei University, 2015.
- [11] Lin JR, Zhou H, Lai XP, *et al.* Genetic identification of edible birds' nest based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Food Res Int*, 2009, (42): 1053–1061.
- [12] 何国林, 陈念, 刘鹏, 等. *TaqMan* 实时荧光定量 PCR 鉴定燕窝方法的建立[J]. *生物技术通讯*, 2015, 1(26): 111–115.
- He GL, Chen N, Liu P, *et al.* Identification of bird's nest using *taqman* real-time quantitative PCR [J]. *Lett Biotechnol*, 2015, 1(26): 111–115.
- [13] 王风云, 韩亮, 赖小平. 32 种不同产地与品种商品燕窝的 DNA 基源鉴定[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, (9): 1876–1882.
- Wang FY, Han L, Lai XP. Genetic identification of 32 different origins and categories of commodity edible bird's nest [J]. *World Sci Technol/Mod Tradit Chin Med*, 2015, (9): 1876–1882.
- [14] Wua YJ, Ying CN, Wang B, *et al.* Application of SYBR green PCR and 2DGE methods to authenticate edible bird's nest food [J]. *Food Res Int*, 2010, 43(8): 2020–2026.

(责任编辑: 苏笑芳)

### 作者简介



陈筱婷, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。  
E-mail: lizzy712@163.com