

黑线鳕鱼核酸标准样品的研制

蒋丹^{1,2}, 刘宇³, 丁健¹, 马敏敏^{2,4}, 孟菊^{2,4}, 黄耀江^{2,4}

1. 辽宁出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 大连 116001
2. 中央民族大学北京市食品环境与健康工程技术研究中心, 北京 100081
3. 内蒙古通辽市扎鲁特旗动物疫病预防控制中心, 通辽 029100
4. 中纺粮油(湛江)工业有限公司, 湛江 524012

摘要 为推进鱼类物种鉴定, 填补黑线鳕鱼核酸标准样品国内空白, 本研究制备了黑线鳕鱼核酸标准样品。研究采用 8 家单位合作定值的方法, 确定了该标准品的 DNA 质量为 $(2.02 \pm 0.07) \mu\text{g}$, $k=2$; DNA 纯度为 (1.82 ± 0.08) , $k=2$ 。并对该标准品的均匀性、稳定性进行了测试, 结果表明该样品均匀性与稳定性均达到国家标准样品的技术要求, 可用于黑线鳕鱼物种鉴定中方法验证和质量控制。

关键词 黑线鳕鱼; 物种鉴定; DNA 标准样品; 均匀性; 稳定性; 不确定度

鳕形目(Gadiforme)中的大部分鱼类是营养价值高的经济鱼类, 尤其在中国渤海、东海等海洋区域, 是沿海居民的主要食用鱼类, 也是出入境检验检疫中十分常见的海洋鱼类^[1]。鳕形目中的黑线鳕鱼(*Melanogrammus aeglefinus*)肉味甘美、营养丰富, 其肝油中营养成分比例是人体每日所需要量的最佳比例, 北欧人将其称为餐桌上的“营养师”^[2]。在水产市场及出入境检验中常有发现鱼类掺假现象^[3], 例如一种名为黑鳕鱼(*Anoplopoma fimbria*)的鱼类, 因形态相似, 常被认为是鳕形目的黑线鳕鱼, 但实际上与黑线鳕鱼的营养价值相差甚远^[4]。因此, 对海洋鱼类的准确分类与快速鉴定非常重要。

传统的形态学鉴定方法在物种鉴定和评价其质量研究中发挥了重要作用, 但也存在明显的缺点, 往往局限于物种的某个生长时期、依赖具有经验的专家鉴别, 而且鉴别不准确的现象十分普遍^[5]。对于加工后的鱼类产品, 传统形态分类收效甚微^[6-7], 现代分子生物学技术在物种鉴定中发挥着越来越关键的作用, 例如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)与 DNA 条形码技术在鱼类鉴定中得到了广泛的应用^[8-11]。这些鉴定方法克服了传统鉴别方法的缺点, 大大加快了鉴定的效率与准确性。

在分子生物学物种鉴定技术中需要对阳性标准样品进行质量控制, 使得检测过程处于控制之中, 从而保证鉴定结果的可靠性^[12-13]。因此在黑线鳕鱼的鉴定中也需要黑线鳕鱼标准样品作为对照, 但目前国内外尚无黑线鳕鱼标准样品, 因此迫切需要黑线鳕鱼标准样品的研制。

经文献分析, *COI* 及 *PanI* 基因在鱼类鉴定中显示出较高的鉴定能力, 尤其是 *COI* 基因在鱼类的分类中具有较高的目内保守性及目间特异性^[14], 通常被选作 DNA 条码序列来进行鱼类物种的鉴别。因此, 本研究为配合 DNA 条码及其他分子生物学物种鉴定技术, 选择以 *COI* 基因作为条码基因研制黑线鳕鱼核酸标准样品。

1 实验材料与仪器

1.1 材料

本研究所选用的黑线鳕鱼样品均来自于北京市水产科学研究院黑线鳕鱼鱼种, 由辽宁省出入境检验检疫局鉴定。

1.2 仪器

GelDoc XR+凝胶成像系统, My cycler PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); 梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); 紫外可见光光度计(美国 Thermo 公司 Nanodrop2000)。

收稿日期: 2016-10-21; 修回日期: 2017-03-21

基金项目: 质检公益性行业科研专项(2013IK291); 教育部新世纪优秀人才项目(NCET-11-0842); 统筹推进一流大学和一流学科建设经费(10301-0150200604); 中央民族大学学术团队建设项目(2015MDTD25C&2015MDTD13C)

作者简介: 蒋丹, 高级工程师, 研究方向为食品安全与健康, 电子信箱: jiangdan66@163.com; 刘宇(共同第一作者), 高级兽医师, 研究方向检验检疫、人畜共患病, 电子信箱: steven06510@hotmail.com; 黄耀江(通信作者), 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学、食品安全与环境健康, 电子信箱: yaojiangh@hotmail.com

引用格式: 蒋丹, 刘宇, 丁健, 等. 黑线鳕鱼核酸标准样品的研制[J]. 科技导报, 2017, 35(9): 100-106; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.09.013

1.3 试剂

海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit、Taq DNA Polymerase、dNTP Mixture、PCR buffer (含 MgCl₂)、DNA 片段回收纯化试剂盒 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit、连接及克隆试剂盒 DNA Ligation Kit、AL5000 DNA Marker 均购于大连宝生物科技有限公司。

2 实验方法

2.1 DNA 的提取

按试剂盒方法提取黑线鳕鱼 DNA, 使用 Nano Drop 2000 紫外可见光光度计检测所有提取 DNA 260/280 值均为 1.8~2.0 时备用, 放置于冰箱 -20℃ 备用。

2.2 质粒标准样品的制备

1) 特异性目标序列的选择与扩增。经文献分析, 选择 *COI* 基因进行同源性分析, 确定特异性目标序列。引物序列如下。

Primer F: TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG,
Primer R: CACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA

实验采用 50 μL 扩增体系, 包括 Premix 11 μL, 上下游引物各 2.5 μL, DNA 模板 2 μL, 加灭菌双蒸水 32 μL。扩增程序: 94℃ 预变性 5 min 后, 30 个循环 (94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s), 最后 72℃ 延伸 7 min。

2) PCR 产物回收及连接转化。PCR 产物的回收及连接转化均采用试剂盒方法。

3) 克隆产物序列比对。转化后选取的阳性菌落经培养进行 PCR 扩增、测序及比对, 序列结果与黑线鳕鱼相似度 100% 的菌液备用。

4) 质粒的提取与标准品的制备。

(1) 质粒的提取及纯度测定。试剂盒法提取质粒 9 份。测试每份质粒 DNA 260/280 比值, 以测定质粒纯度。同时每份质粒进行电泳观察带型, 根据条带质量判断质粒完整性。

(2) 标准样品的制备。选取纯度和完整性均合格的质粒, 将溶液混合在一起, 测定质量和纯度, 调整溶液质量浓度值 10.000 μg/mL, 按 2 μg/管进行分装 500 管并冻干, 将制备好的标准样品置于 -80℃ 冰箱保存。

2.3 均匀性检测

DNA 重组质粒均匀性测试在同一实验室且同一条件下, 由相同实验人员利用相同测试方法及同一仪器在较短的时间内完成。

按简单随机抽样法抽取 20 管, 编号 201~220, 每管重复测试 3 次。测试顺序: 第 1 次, 201~220; 第 2 次, 220~201; 第 3 次, 单数 201~219, 偶数 202~220, 分别检测质粒的质量与质量浓度, 数据通过方差分析及 *F* 检验判断管间样品均匀性。

2.4 稳定性检测

1) 运输稳定性。随机抽取冻干样本分别在 -20、0、4、

25、37℃ 条件下, 放置 2 周。每个温度下随机放置 4 管, 进行质粒电泳观察条带完整性。

2) 储存稳定性。在 -20℃ 条件下, 于 5、10、15、20、25 个月各时间点随机取样 4 管, 每管重复测试 3 次质量和纯度, 数据通过方差分析及 *F* 检验判断储存稳定性。并将质粒进行电泳观察条带完整性。

2.5 多家单位协作定值

根据《标准物质/标准样品生产者能力认可准则—CNAS/CL04》(ISO 导则 34)^[15] 要求, 采用 8 家单位协作定值的方式, 除辽宁出入境检验检疫局检验检疫局外, 另选取 7 家实验室采用紫外分光光度法共同对制备的标准样品进行定值。每家随机发放 5 管样品, 每管测量 1 次, 共计 40 次。

3 实验结果与分析

3.1 克隆产物序列比对结果

克隆产物测序后经 NCBI 比对分析, 结果如图 1 所示, 与黑线鳕鱼序列的相似度 100%, 说明所制备质粒为黑线鳕鱼的 *COI* 质粒, 序列溯源到黑线鳕鱼的 *COI* 基因, GeneBank 登录号为 KJ205001。(Melanogrammus aeglefinus voucher MT01537 cytochrome oxidase subunit 1 (*COI*) gene, Accession No. KJ205001.1)。



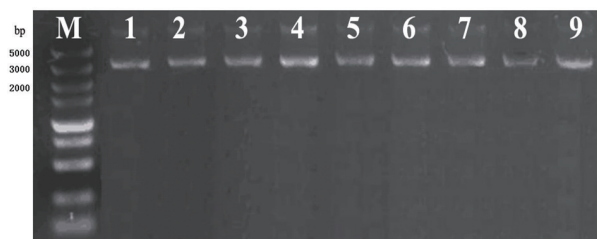
图 1 黑线鳕鱼的序列相似性分析
Fig. 1 Sequence similarity analysis of Melanogrammus aeglefinus

3.2 质粒纯度测定结果

经测试 9 份质粒吸光度比值均在 1.8~2.0 之间, 说明 9 份质粒纯度均符合制备要求。9 份质粒电泳结果如图 2 所示, 重组质粒带型均无明显的杂带, 提示其完整性较好。

3.3 均匀性

质量、纯度测试数据及数据分析结果见表 1~表 3。质量的样本估算标准偏差 $s=0.021$, 纯度的样本估算标准偏差 $s=0.006$ 。当显著性水平 $\alpha=0.05$, 组间自由度 $f_1=19$, 组内自由度 $f_2=40$ 时 *F* 临界值为 1.85, 质量与纯度的 *F* 比均小于各自 *F* 临



注: M 为 DNA marker, 1~9 为 9 份质粒 DNA

图 2 9 份提取质粒电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of recombinant plasmid

界值,说明样品管内及管间均无显著性差异,样品均匀性符合要求。

3.4 稳定性检测

1) 运输稳定性。运输稳定性实验结果如图 3,通过质粒电泳图观察,-20、0、4 与 25℃组质粒条带较清晰,而 37℃组质粒条带明显变弱(图 3(e)),表明温度在 25℃以下保存 2 周之内的质粒标准样品是稳定的,满足短期运输的需要。

2) 储存稳定性。质量、纯度测试数据及数据分析结果见表 4~表 8。经方差分析及 F 检验,结合 T 检验,质量的样本标准偏差 $s=0.026$,纯度的样本标准偏差 $s=0.041$ 。当显著性

表 1 均匀性实验结果

Table 1 Homogeneity of samples

样品编号	第 1 次		第 2 次		第 3 次	
	质量/ μg	纯度	质量/ μg	纯度	质量/ μg	纯度
201	2.059	1.819	2.004	1.827	2.092	1.791
202	2.040	1.819	2.092	1.812	2.046	1.801
203	2.035	1.809	2.021	1.790	2.037	1.811
204	2.062	1.825	2.034	1.827	2.055	1.804
205	2.006	1.789	1.99	1.794	2.192	1.812
206	2.054	1.806	2.075	1.792	2.094	1.806
207	2.097	1.805	1.906	1.793	2.010	1.796
208	1.993	1.809	2.087	1.812	1.989	1.822
209	2.064	1.796	2.060	1.805	2.052	1.804
210	1.986	1.806	1.975	1.822	2.008	1.824
211	2.036	1.812	2.015	1.819	2.076	1.815
212	1.993	1.835	1.982	1.815	1.975	1.813
213	2.038	1.803	2.042	1.819	2.021	1.814
214	2.046	1.792	2.042	1.812	2.069	1.794
215	1.971	1.824	1.976	1.829	1.985	1.804
216	1.976	1.795	1.964	1.794	1.959	1.804
217	1.945	1.814	2.140	1.807	2.136	1.791
218	2.158	1.803	1.933	1.827	1.950	1.819
219	1.991	1.801	1.982	1.813	1.977	1.805
220	2.009	1.802	1.982	1.824	1.980	1.803

表 2 质量均匀性方差分析结果

Table 2 Results of variance analysis for quality homogeneity

组别	平方和	自由度	均方差	F 比	F 临界值	标准偏差	置信区间
组间	0.072483	19	0.003815	1.30	1.85	0.021059	95%
组内	0.117118	40	0.002928				

表 3 纯度均匀性方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis for purity homogeneity

组别	平方和	自由度	均方差	F 比	F 临界值	标准偏差	置信区间
组间	0.003584	19	0.000189	1.72	1.85	0.006292	95%
组内	0.004378	40	0.000109				

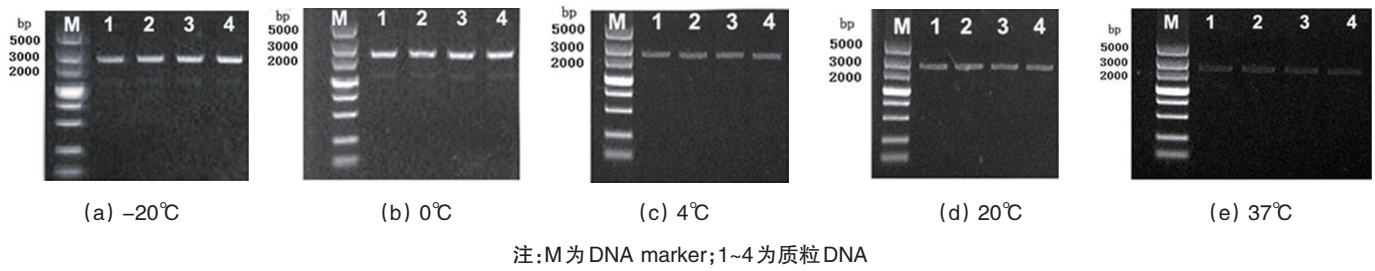


图3 不同温度下存放的DNA电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of DNA under various temperature

水平 $\alpha=0.05$, 组间自由度 $f_1=4$, 组内自由度 $f_2=15$ 时 F 临界值为 3.06, 质量与纯度的 F 比均小于各自 F 临界值; 在检验测试取样本量 $n=20$ 时, 置信区间为 95% 时, t 临界值为 3.18, 质量及纯度的斜率绝对值 $|b_i|$ 均小于 t 临界值与斜率标准偏差 $s_{(b_i)}$ 的

乘积, 斜率与 0 的差异不显著, 说明 -20°C 条件下, 样品 2 年内无明显差异, 样品储存稳定性符合要求。质粒电泳结果如图 4 所示, 所选储存时间质粒电泳条带均完好清晰, 也验证该标准样品 2 年内稳定, 满足实验室要求。

表 4 储存稳定性实验结果

Table 4 Experimental results of instability

样品编号	时长/月	第 1 次		第 2 次		第 3 次	
		质量/ μg	纯度	质量/ μg	纯度	质量/ μg	纯度
401	5	2.055	1.545	2.036	1.548	2.082	1.541
402	5	2.134	1.835	2.223	1.835	2.135	1.831
403	5	1.884	1.594	1.885	1.595	1.887	1.599
404	5	1.943	1.691	1.946	1.695	1.948	1.694
405	10	1.913	1.802	1.914	1.804	1.916	1.805
406	10	1.856	1.862	1.882	1.864	1.883	1.862
407	10	1.958	1.654	1.949	1.653	1.948	1.651
408	10	2.085	1.793	2.087	1.829	2.080	1.696
409	15	2.187	1.534	2.189	1.535	2.183	1.537
410	15	2.064	1.634	2.130	1.635	2.296	1.638
411	15	1.962	1.569	1.839	1.567	2.117	1.566
412	15	1.854	1.845	1.945	1.846	2.031	1.843
413	20	1.945	2.015	2.023	2.103	2.065	2.102
414	20	2.039	1.638	2.024	1.634	2.027	1.632
415	20	1.848	1.657	1.844	1.752	1.845	1.755
416	20	1.946	1.763	1.945	1.764	1.947	1.764
417	24	2.010	1.859	1.945	1.853	1.864	1.857
418	24	1.984	1.856	2.135	1.854	1.825	1.855
419	24	2.036	1.756	2.161	1.757	2.267	1.756
420	24	2.486	1.763	2.488	1.663	2.487	1.866

表 5 质量稳定性方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis for quality instability

组别	平方和	自由度	均方差	F 比	F 临界值	标准偏差	置信区间
组间	0.0978	4	0.024456	1.13	3.06	0.0264	95%
组内	0.3249	15	0.021663				

表6 质量稳定性数据 T 检验分析结果

Table 6 Results of T analysis for quality instability data

结果总平均值/ μg	均值斜率 b_1	标准偏差 s	斜率标准偏差 $s_{(b_1)}$	t 临界值
2.027	0.00508	0.07853	0.00517	3.18
时间平均值	均值截距 b_0	方差 s^2	斜率绝对值 $ b_1 $	t 临界值*斜率标准偏差 $s_{(b_1)}$
14.8	1.95168	0.00617	0.00508	0.02

表7 纯度稳定性方差分析结果

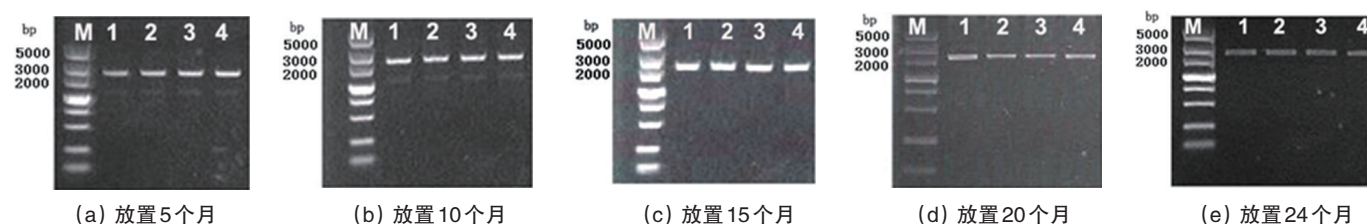
Table 7 Results of variance analysis for purity instability

组别	平方和	自由度	均方差	F 比	F 临界值	标准偏差	置信区间
组间	0.0932	4	0.023300	1.41	3.06	0.0410	95%
组内	0.2486	15	0.016576				

表8 纯度稳定性数据 T 检验分析结果

Table 8 Results of T analysis for purity instability data

结果总平均值/ μg	均值斜率 b_1	标准偏差 s	斜率标准偏差 $s_{(b_1)}$	t 临界值
1.738	0.00636	0.06825	0.00449	3.18
时间平均值	均值截距 b_0	方差 s^2	斜率绝对值 $ b_1 $	t 临界值*斜率标准偏差 $s_{(b_1)}$
14.8	1.64427	0.00466	0.00636	0.01



注: M 为 DNA marker; 1~4 为质粒 DNA

图4 存储不同时间长度的 DNA 电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of Plasmid in different time duration

3.5 定值

该质粒经 8 家单位合作定值结果如表 9、表 10, 最后确定此黑线鳕鱼核酸标准样品的值: DNA 质量为 $(2.02 \pm 0.07) \mu\text{g}$,

$k=2$; DNA 纯度为 1.82 ± 0.08 , $k=2$ 。表明经多家单位合作定值, 所研制的黑线鳕鱼标准样品质量和纯度均合格, 所获取样品数据的不确定度低, 所测得数据有效, 制备样品符合标准。

表9 黑线鳕鱼实验室定值结果

Table 9 Certification value of *Melanogrammus aeglefinus*

实验室	样品编号	质量/ μg	纯度
辽宁出入境检验检疫局	501	2.059	1.80
	502	2.040	1.80
	503	2.035	1.80
	504	2.062	1.80
	505	2.006	1.80

表9 黑线鳕鱼实验室定值结果(续表)

Table 9 Certification value of *Melanogrammus aeglefinus* (continued)

实验室	样品编号	质量/ μg	纯度
四川出入境检验检疫局	506	2.054	1.81
	507	2.097	1.81
	508	1.993	1.80
	509	2.064	1.80
	510	1.986	1.80
大连出入境检验检疫局	511	2.036	1.86
	512	1.993	1.86
	513	2.038	1.81
	514	2.046	1.81
	515	1.971	1.81
吉林出入境检验检疫局	516	1.976	1.80
	517	1.945	1.80
	518	2.158	1.86
	519	1.991	1.86
	520	2.009	1.86
山东出入境检验检疫局	521	2.004	1.80
	522	2.092	1.81
	523	2.021	1.80
	524	2.034	1.80
	525	1.990	1.80
丹东出入境检验检疫局	526	2.075	1.81
	527	1.906	1.86
	528	2.087	1.81
	529	2.060	1.81
	530	1.975	1.81
辽宁师范大学	531	2.015	1.86
	532	1.982	1.80
	533	2.042	1.86
	534	2.042	1.86
	535	1.976	1.86
中央民族大学	536	1.964	1.80
	537	2.140	1.81
	538	1.933	1.80
	539	1.982	1.80
	540	1.982	1.80

表10 黑线鳕鱼不确定度结果

Table 10 Uncertainty results of *Melanogrammus aeglefinus*

参数	质量/ μg	纯度
平均值标准差	0.013693	0.018529
不均匀性标准差	0.021059	0.006292
储存不稳定性标准差	0.026400	0.041000
合成不确定度	0.034116	0.041994
扩展不确定度($k=2$)	0.068231	0.083988

4 结论

食品安全监管中,关于加工后食品物种混淆,以次充好等现象屡见不鲜,例如轰动欧洲的“马肉风波”等,因此食品中物种鉴定方法急需完善。标准样品是物种鉴定分子生物学领域必不可少的参考标准,而核酸标准样品因为容易获得、使用方便、保存稳定及成本低廉等优点成为标准样品研制的发展方向。核酸标准样品为物种鉴定分子生物学方法的验证,为检测仪器的校准都提供了依据,在实验室检测过程中保证了检测结果的可靠性。

本文研制出黑线鳕鱼核酸标准样品,经8家单位合作定

值的方法确定了该标准品的DNA质量为 $(2.02\pm 0.07)\mu\text{g}$, $k=2$; DNA纯度为 1.82 ± 0.08 , $k=2$ 。该样品均匀性与稳定性均达到国家标准样品的技术要求, 可以作为黑线鲈鱼核酸标准样品用于鱼类物种鉴定工作中。

参考文献 (References)

- [1] 王远红, 陈四清, 吕志华, 等. 圆斑星鲈的营养成分分析[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 271-272.
Wang Yuanhong, Chen Siqing, Lv Zhihua, et al. Nutritional component analysis of Spotted halibut[J]. Journal of Nutrition, 2006, 28(3): 271-272.
- [2] 于琴芳, 邓放明. 鲢鱼小黄鱼鳕鱼和海鳗肌肉中营养成分分析及评价[J]. 农产品加工, 2012(9): 11-14.
Yu Qinfang, Deng Fangming. Muscle nutritional component analysis and evaluation of Silver carp, croaker, Gadus and conger pike[J]. Academic periodical of Farm products processing, 2012(9): 11-14.
- [3] 邢薇, 罗琳, 李铁梁. 鲟鱼营养价值研究进展[J]. 中国水产, 2014(9): 70-73.
Xing Wei, Luo Lin, Li Tieliang. The Nutritional value research development of Sturgeon[J]. China Fisheries, 2014(9): 70-73.
- [4] 罗殷, 王锡昌, 刘源. 黄鳍金枪鱼食用品质的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 476-480.
Luo Yin, Wang Xichang, Liu Yuan. The food quality research of Yellowfin tuna[J]. Food Science, 2008, 29(9): 476-480.
- [5] Hawksworth D L, Kalin-Arroyo M T. Magnitude and distribution of biodiversity[M]//Heywood V H, Watson R T. Global biodiversity assessment. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- [6] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [7] 林森杰, 王路, 郑连明, 等. 海洋生物DNA条形码研究现状与展望[J]. 海洋学报, 2014, 36(12): 1-17.
Lin Senjie, Wang Lu, Zheng Lianming, et al. The DNA barcoding research status and prospect of Marine organisms[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2014, 36(12): 1-17.
- [8] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, et al. Plant DNA barcoding in China[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 165-168.
- [9] Li M, Cao H, BUT P P H, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 271-283.
- [10] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物DNA条形码研究进展[J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417-425.
Ning Shuping, Yan Haifei, Hao Gang, et al. The development research of plants DNA barcoding[J]. Biodiversity, 2008, 16(5): 417-425.
- [11] Hollingsworth M L, Andra Clark A, Forrest L L, et al. Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(2): 439-457.
- [12] 陈伟珠, 晋文慧, 方华, 等. 角鲨烯国家标准样品的研制[J]. 食品科学, 2015, 36(12): 166-170.
Chen Weizhu, Jin Wenhui, Fang Hua, et al. The development squalene standard sample[J]. Food Science, 2015, 36(12): 166-170.
- [13] 郑秋月, 曹际娟, 徐君怡, 等. 转基因玉米质粒分子国家标准样品的构建[J]. 标准科学, 2012(12): 48-51.
Zheng Qiuyue, Cao Jijuan, Xu Junyi, et al. The construction of genetically modified corn plasmid national standard samples[J]. Standard Science, 2012(12): 48-51.
- [14] Hubalkova Z, Kralik P, Kasalova J, et al. Identification of gadoid species in fish meat by polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2008, 56(10): 3454-3459.
- [15] Guide ISO. General requirements for the competence of reference material producers[S]. Geneva: International Organization for standardization, 2000.

The development of a *Melanogrammus aeglefinus* DNA standard sample

JIANG Dan¹, LIU Yu³, DING Jian¹, MA Minmin^{2,4}, Meng Ju^{2,4}, HUANG Yaojiang^{2,4}

1. Inspection and Quarantine Technology Center of Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China
2. Beijing Engineering Research Center of Food Environment and Public Health in Minzu University of China, Beijing 100081, China
3. Inner Mongolia Animal Disease Prevention and Control Center of Jarud, Tongliao 029100, China
4. Chinatex Grains & Oils (Zhanjiang) Industries Co.,LTD., Zhanjiang 524012, China

Abstract To help identify marine fish and provide a reference standard for identification of *Melanogrammus aeglefinus*, a standard sample for *Melanogrammus aeglefinus* is established in this study. With collaboration of eight labs, concentration and quality of DNA are tested. The concentration value is $(2.02\pm 0.07)\mu\text{g}$ ($k=2$) and the purity value of DNA is 1.82 ± 0.08 ($k=2$) which indicates good quality of samples. PCR and electrophoresis are used to test the uniformity, stability and value analysis of the samples. The results show that these samples in this study meet the technical requirements of national standards and that the method can be used for calibration and quality control of *Melanogrammus aeglefinus*.

Keywords *Melanogrammus aeglefinus*; molecular identification; standard sample; homogeneity; stability; uncertainty

(责任编辑 田恬)