

ICS 67.100.01

CCS X 16

# 团体标准

T/RB XXXX—20XX

## 内分泌干扰物检测 转基因斑马鱼法

Detection of Endocrine Active Substances, Acting Through  
Estrogen Receptors, Using Transgenic Zebrafish

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国乳制品工业协会

发布

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由中国乳制品工业协会归口。

本文件起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、完美（广东）日用品有限公司、朴诚乳业（集团）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、浙江省食品药品检验研究院、国家食品安全风险评估中心、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、宁波海关技术中心、君乐宝乳业集团。

本文件主要起草人：徐懿乔、曹兵兵、朱晓宇、解庆刚、毛新亮、高业成、张迎春、王飞飞、代荣波、贾旭东、刘姗、梁晶晶、赵超群、逯刚、董立雅、邱静、刘汉伟、黄亚芳、周佳丽、黄燕烽、缪文钰。

# 内分泌干扰物检测 转基因斑马鱼法

## 1 范围

本文件规定了利用转基因斑马鱼检测内分泌干扰物的方法。

本文件不适用于检测不能溶解、乳化或制备成均匀分散的悬浮液的受试样品。

本文件不适用于自身产生绿色荧光的受试样品。

## 2 规范性引用文件

GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制

GB/T 21807 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验 术语和定义 试验溶液

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 斑马鱼 Zebrafish

脊椎动物，生物分类学上属于脊椎动物门、硬骨鱼纲、鲤鱼目、鲤科、斑马鱼属、斑马鱼种，可用于教学和科研的模式动物。

### 3.2 受精后天数 Day(s) Post-fertilization, dpf

受精卵受精后的天数。

### 3.3 无可观察效应浓度 No Observed Toxic Effect Concentration, NOEC

与对照组相比，对试验生物未产生明显毒性效应的最高受试样品浓度。

## 4 方法原理

在雌激素作用下，雌激素受体（Estrogen receptor, ER）ERs的基因在肝脏中的表达会明显上调。因此，ERs的基因可以作为生物体内雌激素活性检测的典型生物标志物。本方法使用的雌激素斑马鱼的构建是以UAS-GFP基因表达调控系统为基础，利用优化重组的雌激素响应元件（ERE）驱动上游质粒GFP的表达，进而对下游UAS质粒中荧光基因eGFP表达进行调控。类雌激素物质能刺激5×ERE响应，激活GFP的表达，而GFP蛋白可与UAS结合，进而驱动绿色荧光蛋白（EGFP）的表达，从而达到方便、直观、动态检测环境类雌激素物质是否存在及其浓度的目的。

## 5 试剂和材料

### 5.1 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐（ $C_9H_{11}NO_2 \cdot CH_3O_3S$ ，简称MESAB）

将 MESAB 与  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  以 1:5 的总质量比混合，配制成 4 mg/mL 溶液，放置在 4°C 储存。使用时用标准稀释水进行稀释，终浓度为 0.16 mg/mL。

## 5.2 甲基纤维素

甲基纤维素用超纯水配制成体积分数为 3% 的液体胶状物：将甲基纤维素缓慢加入沸水中，边加边搅拌，甲基纤维素完全溶解后，继续搅拌至冷却到室温；用锡箔纸密封烧杯口，放置在 4°C 储存。

## 5.3 标准稀释水

配制方法见附录 A。

## 5.4 阳性对照药

雌二醇用二甲基亚砷配制成 1.00 mg/mL 溶液，振荡混匀，使用时终浓度为 5.00 ng/mL。

## 6 仪器设备

### 6.1 生化培养箱

带有温控和进风装置，温度控制范围 5 °C~50 °C，精度 $\pm 0.1$  °C。

### 6.2 电子天平

分度值为 0.0001 g。

### 6.3 水质检测设备

盐度计（电导率测定仪）、硬度计、pH 计、溶解氧测定仪。

### 6.4 体视显微镜

### 6.5 体视荧光显微镜

需配有绿色荧光通道。

## 7 试验准备

### 7.1 斑马鱼准备

按照 GB/T 39649 的规定执行斑马鱼质量控制。

使用转基因雌激素 Tg (5xERE:GFF; UAS:EGFP) 荧光斑马鱼品系。

在体视显微镜下挑选每孔 30 尾发育正常且发育阶段一致的 4 dpf 斑马鱼，置于 3 mL 烧杯中进行孵育，水温控制在 26-28.5 °C。斑马鱼典型图见附录 B。

## 7.2 受试样品信息确认

应从受试样品提供方获得如下样品信息：

受试样品的名称、批号、规格、数量、包装、颜色性状、主要质量标志物及含量（如有）、保存条件、有效期、申请单位名称、理化性质、功能主治等信息。

a) 受试样品为单体成分时，还应提供相应的化学信息，包括：结构式、分子量、纯度等。

b) 受试样品的助溶剂信息，在助溶剂中的溶解度，在水中、光中、实验条件下的稳定性，pH。

c) 整个周期所用受试样品批号应一致。

## 7.3 受试样品前处理

7.3.1 参考表1的方法对不同类型受试样品进行前处理。

表1 不同类型受试样品前处理方法

样品类型	前处理方法
固体类	依次经过粉碎、提取、超声、均质、化学提取后氮吹制备受试样品
液体类	冷冻干燥或化学提取后氮吹制备受试样品
油类	依次经过去除软胶囊壳、内容物减压干燥制备受试样品

化学提取具体方法如下：1) 取10 g奶粉置于50 mL离心管中，共4管；2) 分别向每个离心管中加入15 mL超纯水，涡旋1min，混匀，（水浴锅预热至35~40℃）超声5min，之后分别在每个离心管中加入22.5 mL乙腈，涡旋1min，混匀，超声5 min；3) 分别向每个离心管中加入6.0 g氯化钠，涡旋1min,混匀1000 rpm，离心10min，将离心完的上清液装入离心管中；4) 将含有上清液的离心管，放置到氮吹仪中，氮吹至干燥，加入4 mL甲醇复溶，随后将液体移入装有300 mg C18的5 mL离心管，涡旋30 s，于4000 rpm，离心1min，取净化过的上清液过0.22 μm滤膜，进行过滤，收集液体。

7.3.2 受试样品储备液宜用标准稀释水配制，受试样品难以用水溶解时可考虑使用低毒的助溶剂或分散剂。推荐的助溶剂：丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、三甘醇。适合的分散剂：聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温 80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。

7.3.3 储备液配制完成的受试样品应做标识，包括受试样品名称、受试样品浓度、助溶剂名称、配制日期、有效期、储存条件、配制人。

7.3.4 经前处理且做好标识的受试样品准备完成后，进入斑马鱼准备阶段。

## 8 试验程序

## 8.1 暴露条件

### 8.1.1 给药

在斑马鱼 4 dpf 下午在六孔板中给予受试样品，以每组 3 mL 标准稀释水 30 尾斑马鱼的实验体系孵育。斑马鱼 5 dpf 下午，在标准稀释水中用筛网将斑马鱼洗脱 3 次，结束暴露。给药持续时间为 24 小时。

### 8.1.2 光照

暴露期间避光处理，避免光照对受试样品稳定性的影响。

### 8.1.3 温度

26~28.5 °C。

### 8.1.4 溶解氧

6 mg/L 饱和溶解氧。

### 8.1.5 pH

6.8~7.5。

## 8.2 预实验

### 8.2.1 试验分组

a) 正常对照组：用标准稀释水处理的正常斑马鱼。

b) 溶剂对照组：用溶剂处理的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的助溶剂或分散剂，则应设置该组。

c) 受试样品处理组：含有受试样品斑马鱼，受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

### 8.2.2 受试样品组别设置

将受试样品储备液用标准稀释水以几何级数稀释成一组适宜的浓度系列，备用。宜设置 3~5 个浓度组，以几何级数浓度系列设置受试样品浓度梯度，浓度的间隔系数  $\leq 3.2$ ，宜设为 2。

### 8.2.3 确定 NOEC

a) 死亡判断标准：静止不动、无心脏跳动、躯干呈不透明颜色、对机械刺激无反应。

b) 异常表型：心包水肿、静脉瘀血、血流缺失/减少、出血、脑变性/萎缩/水肿、下颌畸形、眼畸形/水肿、肝脏变性/肿大/萎缩、卵黄囊吸收延迟、肠道发育异常、躯干弯曲/缩短/水肿、肌肉变性、鳔未充气。异常表型的典型图见附录 B。

c) 异常行为学指标：身体侧翻、游动不协调、游动剧烈和反常的静止。

### 8.3 正式试验

#### 8.3.1 试验分组

a) 正常对照组：用标准稀释水处理的正常斑马鱼。

b) 溶剂对照组：含有溶剂的斑马鱼。如果受试样品配制过程中使用了本文件以外的助溶剂或分散剂，则应设置该组。

c) 阳性对照组：用雌二醇处理的斑马鱼，每次试验设置一个阳性对照组即可。

d) 受试样品处理组：含有受试样品斑马鱼，受试样品根据需要设置多个不同浓度组。

注：如果使用了溶剂，所有组别中的溶剂浓度应保持相同，且浓度不大于 1% (W/V 或 V/V)。

#### 8.3.2 受试样品浓度设置

根据预试验的结果，确定正式试验的浓度范围，试验最高浓度组不得高于 NOEC 值或该类受试样品的最大溶解度。以几何级数浓度系列设置至少 3 个不同的受试样品浓度组，浓度的间隔系数不大于 3.2。浓度设置少于 3 个时需说明理由。

#### 8.3.3 数据采集

孵育结束后，从表型正常的斑马鱼中随机选取至少 10 尾斑马鱼，用三卡因麻醉后，将斑马鱼用 3% 甲基纤维素固定（甲基纤维素应提前在室温放置至少 30 分钟），在体视荧光显微镜下观察、拍照并保存。所有试验组斑马鱼拍照应在相同的仪器和环境条件下完成，且斑马鱼体位保持一致。利用图像处理软件测量肝脏荧光强度（代表雌激素的相对含量），每组的有效数据量不低于 10 个。

## 9 数据处理与结果判定

### 9.1 统计分析

利用统计分析软件进行相关图表制作与统计学分析。计算各组试验的平均值 (Mean) 及标准误差 (Standard Error, SE)，统计学处理结果用  $\text{Mean} \pm \text{SE}$  表示。宜采用方差分析，按方差分析的程序先进行正态性检验 ( $P$  值) 和方差齐性检验 ( $F$  值)。当  $F < 0.05$ ,  $P < 0.05$  时，各组均数间组间至少有一组有显著性差异，宜采用非参数检验。当  $F \geq 0.05$ ,  $P \geq 0.05$  时，采用单因素方差分析，选择事后两两比较的结果进行

统计。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

## 9.2 结果判定

### 9.2.1 试验质量评价

a) 正常对照组（如果使用了助溶剂，也包括溶剂对照组）斑马鱼的死亡率或异常率不得超过 10%，超过 10% 则该次试验视为失败。

b) 正式试验中，如果使用了助溶剂，溶剂对照组与正常对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果溶剂对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异，则该次试验视为无效。

c) 正式试验中，阳性对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异，否则该次试验结果视为无效。

### 9.2.2 判定标准

使用统计分析软件对数据进行方差分析，比较受试样品各浓度组与正常对照组原始数据的统计学差异， $P < 0.05$  表示具有统计学差异，判定为受试样品具有雌激素效应。

注 1：由于受试样品在标准稀释水中的溶解度受限，可能导致结果判定为不具有雌激素效应。

注 2：由于斑马鱼毒性敏感性，导致受试样品浓度设置受限，可能导致结果判定为不具有雌激素效应。

## 10 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- a) 检测依据；
- b) 样品和阳性对照的信息，包括与试验操作相关的理化性状；
- c) 斑马鱼来源和品系等相关信息；
- d) 试验条件和方法；
- e) 数据处理与统计方法；
- f) 试验开始和完成的日期；
- g) 试验结果
- h) 结论。



## 附录 A

(规范性)

## 1×标准稀释水配制方法

## A.1 分别称取以下试剂

- a) 碳酸氢钠：称取 2.52 g  $\text{NaHCO}_3$ ；
- b) 氯化钾：称取 0.22 g  $\text{KCl}$ ；
- c) 氯化钙：称取 11.76 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；
- d) 硫酸镁：称取 4.932 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

## A.2 定容

将 A.1 称取的试剂混合后用去离子水定容至 1 L。用于配制标准稀释水的试剂均为分析纯试剂，去离子水电导率应小于或等于  $10 \mu\text{S}/\text{cm}$ 。

## A.3 将 A.2 用去离子水稀释 40 倍得到标准稀释水。

最终浓度为：63.0 mg/L  $\text{NaHCO}_3$ ，5.5 mg/L  $\text{KCl}$ ，294.0 mg/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，123.3 mg/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

## 附录 B

(规范性)

## 斑马鱼典型图

B.1 斑马鱼整体特征见图 B.1。

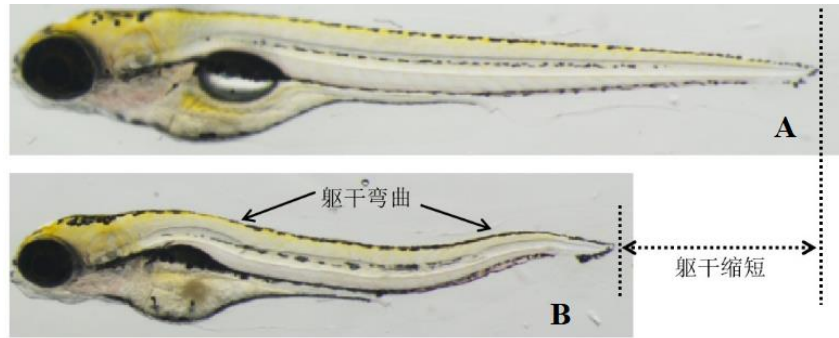


图 B.1 斑马鱼整体图

注：图 A 为正常斑马鱼，图 B 的斑马鱼出现躯干缩短和弯曲。

B.2 斑马鱼主要器官特征见图 B.2。

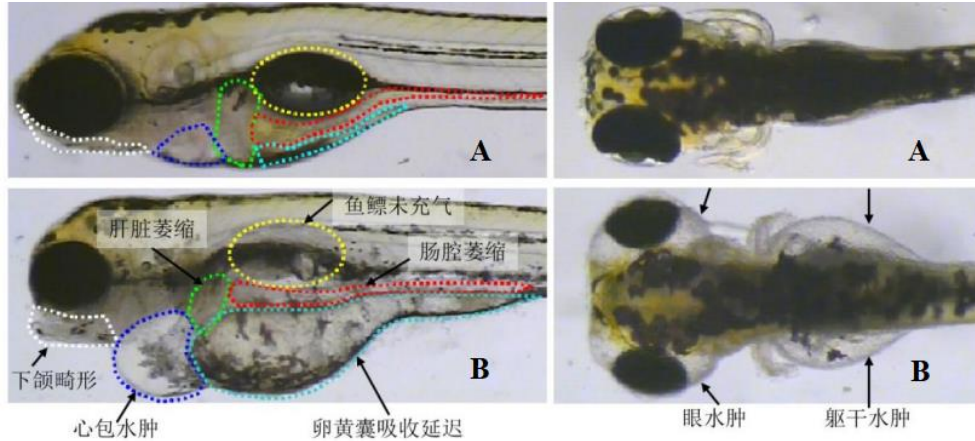


图 B.2 斑马鱼主要组织器官示意图

图 A 为正常斑马鱼，图 B 为表型异常斑马鱼。白色虚线所示为下颌，蓝色虚线所示为心脏，浅绿色虚线所示为肝脏，深绿色虚线所示为卵黄囊，红色虚线所示为肠道，黄色虚线所示为鱼鳔。

B.3 斑马鱼肝脏特征见图 B.3。

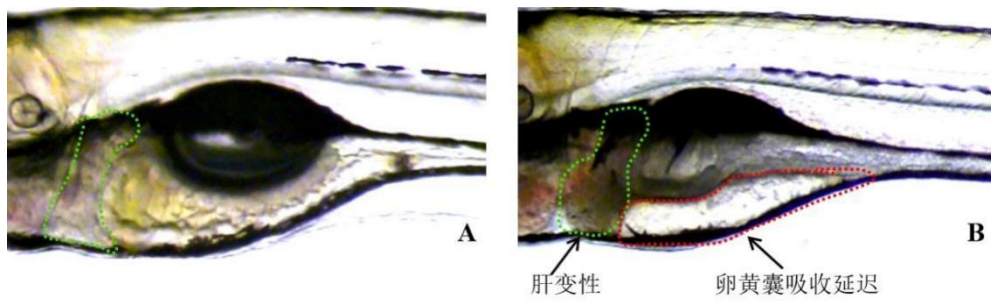


图 B.3 斑马鱼肝脏局部图

图 A 为正常斑马鱼，图 B 斑马鱼出现肝脏发黑（变性）和卵黄囊吸收延迟。绿色虚线所示为肝脏，红色虚线所示为卵黄囊。

B.4 斑马鱼肌肉特征见图 B.4。

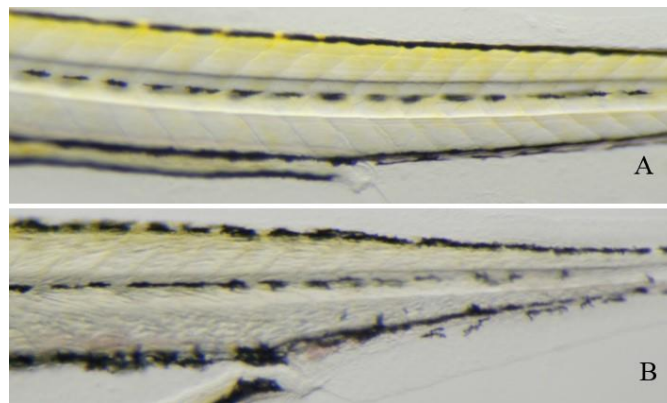


图 B.4 斑马鱼肌肉变性典型图

图A为正常斑马鱼，图B斑马鱼出现肌肉变性（肌肉纹理不清晰、表面不平整、颜色偏暗）

附录 C

(规范性)

斑马鱼雌激素效应典型图

C.1 斑马鱼整体特征见图 C.1。

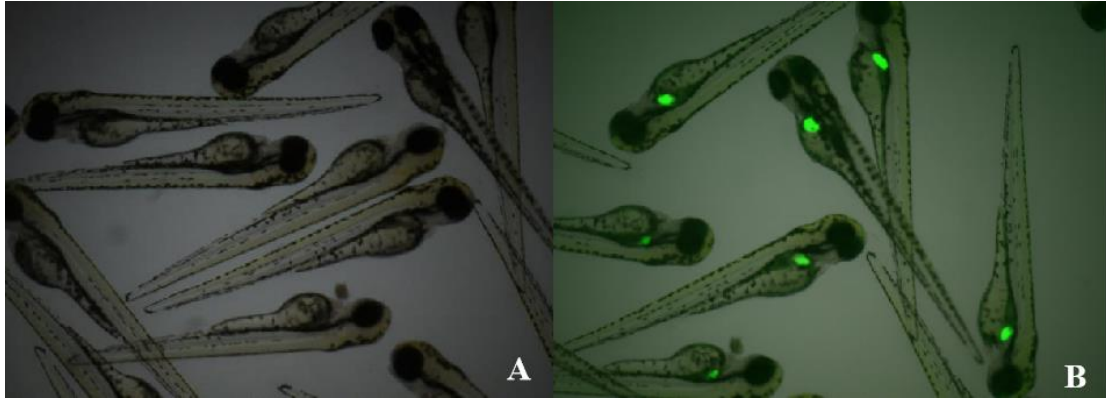


图 C.1 六孔板中斑马鱼整体图

注：图 A 为正常斑马鱼，图 B 为出现雌激素效应的斑马鱼。

C.2 斑马鱼肝脏特征见图 C.2。

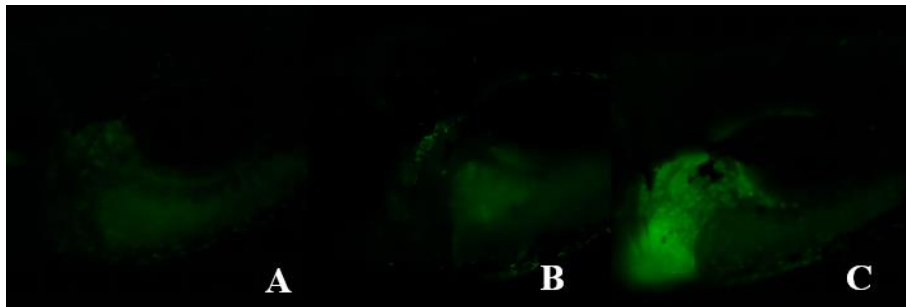


图 C.2 斑马鱼肝脏局部图

图 A 为正常对照组斑马鱼，图 B 为溶剂对照组斑马鱼，图 C 为雌二醇 5.00 ng/mL 处理后的斑马鱼。