

团 体 标 准

斑马鱼胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法
Zebrafish Embryo Acute Toxicity Test
Method A and Method B

目 次

前言.....	2
1.范围.....	3
2.规范性引用文件.....	3
3.术语和定义.....	3
4.测试原理.....	4
5.仪器设备和试剂.....	4
6.测试方法.....	5
7.保证测试结果有效性的条件.....	8
8.测试的解释.....	9
9.报告.....	9
附录 A.....	10
附录 B.....	11
附录 C.....	12
附录 D.....	13
附录 E.....	14
附录 F.....	15

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2009 规则起草。

本标准由广东省毒理学会归口。

本标准起草单位：南方医科大学公共卫生学院、无限极（中国）有限公司、水中银（国际）生物科技有限公司、广东完美生命健康科技研究院有限公司、浙江养生堂天然药物研究所有限公司、汤臣倍健股份有限公司。

本标准主要起草人：黄振烈、刘凤松、陆智、李延川、杜伟樑、陈子翔、陈雪平、黄葆茵、钟怡洲、林莉、毛新亮、高业成、方国珊、李晓娇、张旭光、赵溪

斑马鱼胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法

1. 范围

本标准规定了斑马鱼（Zebrafish; *Danio rerio*）胚胎急性毒性测试 A 法和 B 法的基本要求。

本标准适用于受试物的急性毒性筛查。受试物包含化学品、食品、药物、化妆品、原料及产品。

2. 规范性引用文件

OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris

HJ 1069 - 2019水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3. 术语和定义

3.1. 空白对照 **Blank control**

用作检测受试斑马鱼胚胎质量是否符合测试要求。

3.2. 孔板对照 **Plate control**

用作检测暴露容器是否被生产商或实验操作人员污染或因其他情况可能影响测试结果。

3.3. 鱼胚胎培养液 **Fish embryo culture medium**

用于培养斑马鱼胚胎的溶液。

3.4. 半数致死浓度（ LC_{50} ） **Half lethal concentration**

受试物引起50%受试鱼胚胎死亡的浓度。

4. 测试原理

将 4~128 细胞期斑马鱼胚胎暴露于受试物稀释液中 96 小时（A 法）或 48 小

时（B法）后于显微镜下观察并记录具有凝结、没有心跳或尾巴未脱离特征的死亡鱼胚胎数目，对斑马鱼胚胎死亡率和受试物测试浓度之间进行剂量反应曲线拟合计算半数致死浓度（LC₅₀）。

5. 仪器设备和试剂

5.1. 仪器设备

- 5.1.1. 斑马鱼养殖设备：设备需配有温控装置，水循环和过滤装置，养殖容器用玻璃或其它惰性材料制成。可采用通用斑马鱼养殖设备或按实验室需求配备鱼缸（如 45 cm 长 × 45 cm 宽 × 30 cm 高）。
- 5.1.2. 斑马鱼产卵盒/缸：由玻璃、不锈钢或其它惰性材料制成，网筛（网格大小为 2 mm × 2 mm，由不锈钢或惰性材料组成用来保护鱼卵）。
- 5.1.3. 水质监测设备：pH 计、溶解氧测定仪、盐度计（电导率测定仪）。
- 5.1.4. 丰年虾孵化器：设备需配有打气装置，用于孵化丰年虾卵。
- 5.1.5. 分析天平：精度 0.1 mg。
- 5.1.6. 显微镜：配带照相系统，最大放大倍数应大于 80 倍的立体显微镜。
- 5.1.7. 恒温箱：精度 ±1℃。
- 5.1.8. 测试容器：玻璃或聚苯乙烯实验容器（如 24 孔板、96 孔板、培养皿）。如测试物可能吸附于聚苯乙烯容器时（如非极性化学品），应选用惰性材料（如玻璃）来减少吸附。实验容器在恒温箱中应随机摆放。
- 5.1.9. 其他常规实验仪器和设备：移液管、离心管、玻璃容器（如烧杯、容量瓶等）、试管震荡器、低温冰箱、可调节移液器和吸头、广口吸头（≥1.5 mm 径口）用来吸取鱼胚胎等。

5.2. 试剂

- 5.2.1. 鱼胚胎培养液：用水质符合 GB/T 6682 要求的水和下列化学品配制而成

CaCl ₂	294.0 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123.3 mg/L
NaHCO ₃	63.0 mg/L
KCl	5.5 mg/L

满足下列条件

pH 值	6.5 ~ 8.5
盐度	0.25 ~ 0.50 ‰
溶解氧	≥80% 饱和度
硬度	30 ~ 300 mg/L 碳酸钙
导电率	500 ~ 800 μS/cm

新配置的鱼胚胎培养液用于正式测试前需进行预测试（见 6.5.1.），以确保按照标准测试程序，在测试结束时至少 90%受试鱼胚胎存活。

5.2.2. 急性毒性阳性对照标准储存液：配制 100 mg/L 3,4-二氯苯胺（3,4-dichloroaniline）于去离子水中，避光冷藏，3 个月内有效。新配置的阳性对照标准储存液用于正式测试前需进行预测试（见 6.5.1.），以确保用其新鲜配制的阳性对照标准工作液（见 5.2.2.），按照标准测试程序，在测试结束时应导致至少 30%受试鱼胚胎死亡。

5.2.3. 阳性对照标准工作液：用阳性对照标准储存液新鲜配制 4.0 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液。

5.2.4. 其他常规试剂：甲醇、二甲基亚砜、盐酸、氢氧化钠等，试剂纯度均为分析纯。

6. 测试方法

6.1. 受试物

受试物包含化学品、食品、药物、化妆品、原料及产品。配制受试物测试溶液时，首选溶剂是水，如需用到有机溶剂助溶，可选用甲醇或二甲基亚砜，溶剂于测试溶液中的浓度要≤0.1%。受试物由于特性不同，前处理方法也不同，可参照附录 A。

该方法不适用于分子量≥3 kDa 以及导致鱼胚胎孵化延迟或减低孵化的受试物。

6.2. 剂量

受试物在进行正式测试之前，如不确定急性毒性范围，建议进行预测试，可选择倍数稀释间隔如 1 mg/L，10 mg/L，100 mg/L，1,000 mg/L，10,000 mg/L 受试物浓度，按照标准测试程序，每个浓度用 10 粒斑马鱼胚胎进行预测试，找出敏感范围。如受试物在 10,000 mg/L 浓度对斑马鱼胚胎的致死率<50%，除某些特定需求要进行

更高浓度测试外，通常可以把 10,000 mg/L 作为最高剂量。

正式测试一般设五个测试浓度剂量组，需以不超过 2.2 倍的稀释系数间隔配备，以满足统计学要求。最高浓度最好引起 100% 鱼胚胎死亡，最低浓度应不会引起鱼胚胎死亡，如果相邻两个浓度之间的死亡率超过 50%，建议减低稀释倍数。

另设空白对照组、溶剂对照组和阳性对照组。阳性对照物选用 4.0 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液。所有测试均应设孔板对照。

6.3. 斑马鱼亲鱼养殖

应用来源可靠（如中国国家斑马鱼资源中心）的野生型 AB 品系斑马鱼（*Danio rerio*）产卵测试。亲鱼应具有较好的繁殖能力—鱼龄以 6 ~ 12 月最佳。传代尽量使用侧交以保持遗传多样性，纯品系亲鱼繁殖 5 代后需更换新一批亲鱼。亲鱼不应该有明显可见的感染和疾病特征，且在 2 个月内没有经历过药物治疗。在繁殖产卵测试前，亲鱼应在该环境中驯养 14 天以上。

亲鱼养殖用水需用去离子水和人工海盐配制而成。每公升水加入约 400 mg 人工海盐和约 10 mg NaHCO₃，满足下列条件

盐度	0.25 ~ 0.50 ‰
导电率	400 ~ 800 μS/cm
溶解氧	≥80% 饱和度
pH 值	6.5 ~ 8.5
硬度	30 ~ 300 mg/L CaCO ₃

养殖温度控制在 $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，养殖密度最好控制在每升水 1 ~ 2 条鱼，以及每日固定的 12 ~ 16 小时光照且需保持良好的过滤系统。每天至少喂食 2 次，包括至少 1 次丰年虾。室内温度控制在 20 ~ 25℃。

6.4. 斑马鱼胚胎准备

斑马鱼可在小的产卵缸中产卵，也可以直接在大缸中产卵。若用产卵缸收集鱼卵，将雄鱼和雌鱼（如 2: 1 的比率）在产卵前一天关灯前 1 ~ 2 小时放进产卵缸中。由于斑马鱼偶尔不产卵，建议同时准备多个产卵缸备用。为避免基因偏差，将最少 3 个产卵缸中收集到的鱼卵混合再进行挑选备用。若用大缸收集鱼卵，收卵盒在产卵前一

天关灯前或产卵当天开灯前放进要收集鱼卵的鱼缸中。

为避免鱼卵被成鱼所食，收卵盒用惰性网覆盖。如需要，可在网筛上固定由塑料（不会释放塑化剂）或玻璃制成的人工绿色植物以刺激产卵。交配、产卵和受精在开灯后大约 30 分钟内完成，结束后可把收卵盒移出鱼缸。鱼卵从收卵盒取出后，用鱼胚胎培养液清洁鱼胚胎。

在 26℃ 条件下，受精鱼胚胎在约 45 分钟完成第一次分裂，紧接着分裂成 4、8、16 和 32 个细胞。这时，受精鱼胚胎清晰可辨。

挑选处于 4~32 细胞期的健康鱼胚胎（见附录 B）备用，暴露需在 4~128 细胞期内开始。

6.5. 测试操作和观察指标

6.5.1. 预测试

每个测试组设 10 个平行孔，如预测试在 96 孔板中进行，每孔加入 1 粒斑马鱼胚胎和 0.2 mL 测试溶液。另设孔板对照组，设 4 个平行孔，每孔放入 1 粒斑马鱼胚胎和 0.2 mL 已通过预测试的鱼胚胎培养液。将 96 孔板置于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中暴露 48 ± 2 小时。暴露结束后，在显微镜下观察每粒鱼胚胎（见附录 C 图 C.2）并记录每个测试组死亡胚胎数目。

鱼胚胎培养液，在测试结束时至少 90% 受试鱼胚胎存活，否则需重新配制。

阳性对照标准储存液，用其配制的阳性对照标准工作液在测试结束时至少 30% 受试鱼胚胎死亡，否则需重新配制。

实验室应定期进行鱼胚胎培养液和阳性对照测试。

6.5.2. 测试操作

A法

在 24 孔板中，剂量组加入 2 mL 测试溶液，空白对照组加入等量的鱼胚胎培养液、溶剂对照组加入等量的与样本测试溶液中相同溶剂浓度的溶液、阳性对照组加入等量的 4.0 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液。每个浓度均设 20 个平行孔，每孔加入 1 粒斑马鱼胚胎。另设孔板对照组，加入 2 mL 鱼胚胎培养液，设 4 个平行孔，每孔放入 1 粒斑

马鱼胚胎。将 24 孔板置于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中暴露 96 ± 2 小时。暴露结束后，在显微镜下观察每粒鱼胚胎（见附录 C 图 C.1）。如需获取更多暴露期间受试物对斑马鱼胚胎发育的影响，可在暴露 24 小时和 72 小时增加观察点并记录观察结果。

B法

在 96 孔板中，剂量组加入 0.2 mL 测试溶液，空白对照组加入等量的鱼胚胎培养液、溶剂对照组加入等量的与样本测试溶液中相同溶剂浓度的溶液、阳性对照组加入等量的 4.0 mg/L 3,4-二氯苯胺溶液。每个浓度均设 20 个平行孔，每孔加入 1 粒斑马鱼胚胎。另设孔板对照组，加入 0.2 mL 鱼胚胎培养液，设 4 个平行孔，每孔放入 1 粒斑马鱼胚胎。将 96 孔板置于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温箱中暴露 48 ± 2 小时。暴露结束后，在显微镜下观察每粒鱼胚胎（见附录 C 图 C.2）。如需获取更多暴露期间受试物对斑马鱼胚胎发育的影响，可在暴露 24 小时增加观察点并记录观察结果。

6.5.3. 观察指标

记录每个实验组的鱼胚胎死亡数目。鱼胚胎的死亡判定标准为：具有凝结、没有心跳或尾巴未脱离特征（见附录 D）。

胚胎凝结（Coagulated）：凝结的胚胎在肉眼下呈乳白色，在显微镜下呈黑色。

没有心跳（Lack of heartbeat）：一分钟内心脏没有跳动的胚胎。

尾巴未脱离（Non-detachment of the tail）：尾巴没有从卵黄上脱离开来的胚胎。

6.6. 结果计算与统计

计算半数致死浓度（ LC_{50} ）：采用常用统计方法（如概率单位法）对鱼胚胎死亡率和样本测试浓度之间进行剂量反应曲线拟合计算半数致死浓度（ LC_{50} ）和 95% 置信区间。可参照附录 E 中方法。

7. 保证测试有效性的条件

测试结束时，阳性对照组鱼胚胎死亡率 $\geq 30\%$ ，空白对照组和溶液对照组鱼胚胎存活率 $\geq 90\%$ ，测试结果方为有效。

孔板对照鱼胚胎存活率需 $\geq 75\%$ （即 4 粒鱼胚胎中至少 3 粒鱼胚胎存活），如果某测试组对应的孔板对照存活率 $< 75\%$ ，则该测试组结果无效。如受影响的是空白对

照组或溶液对照组，则需重新测试；如是受试物某浓度，且该浓度处理组也有鱼胚胎死亡，则需评估去除该浓度数据是否会影响结果（ LC_{50} ）而决定该受试物是否需重新测试。

8. 测试结果评价

根据受试物测试结果，可参照附录 F 对受试物的急性毒性进行评价。

9. 报告

测试报告中至少应包括以下几个方面的内容：

- a) 标题；
- b) 报告编号；
- c) 客户名称和联系方式；
- d) 收样日期；
- e) 受试物描述；
- f) 测试日期；
- g) 测试项目；
- h) 测试生物；
- i) 测试条件；
- j) 测试结果；
- k) 结果评价方法；
- l) 结论；
- m) 报告日期；
- n) 报告授权人名称及签名；
- o) 且须注明测试结果只与所测受试物相关。

附录 A

受试物前处理方法

不同受试物的特性不同，前处理方法也不一样。

对于化学品、大部分保健食品（如胶囊和片剂）、药物和原料，可直接将受试物溶解到水中配置成储存液，进一步用鱼胚胎培养液稀释到相应的测试浓度进行测试。如需用到有机溶剂助溶，选用甲醇或二甲基亚砷，且溶剂在测试溶液中的浓度要 $\leq 0.1\%$ 。

对于众多食品、化妆品和产品，因质地复杂需要进行样本前处理，具体可参考下列方法。

化妆品：受试物与甲醇按 1:3 (g:mL；如 0.4 g:1.0 mL) 混匀、超声波处理后 $15,000 \times g$ 离心，取上清液，将上清液稀释到鱼胚胎培养水中进行测试。

食品：受试物与乙腈按 1:1.5 (g:mL；如 10 g:15 mL) 混匀、如水含量不足则加入适量纯净水，加入氯化钠至饱和，混匀后超声波处理后 $6,500 \times g$ 离心，取上清液。重复乙腈提取，混合上清液。加入无水硫酸钠吸取水分。如受试物不含脂肪或脂肪含量低（如 $\leq 3\%$ ），将上清液用氮气吹干后用甲醇或二甲基亚砷溶解提取物，且测试溶液中溶剂浓度最高不能高于 1%；如受试物脂肪含量 $> 3\%$ ，则需将上清液干燥至约 5 mL 时加入 3 mL 正己烷，震荡混匀后 $6,500 \times g$ 离心，取乙腈溶液。重复正己烷去脂步骤，混合乙腈溶液。将乙腈溶液吹干后用甲醇或二甲基亚砷溶解提取物。将提取物稀释到鱼胚胎培养水中进行测试，测试溶液中溶剂浓度最高不能高于 0.1%。

产品：以油漆为例，可以按照上述化妆品方法进行前处理。

附录 B

斑马鱼4~128细胞期胚胎代表性图片

斑马鱼胚胎处于不同细胞期形态见图B.1。

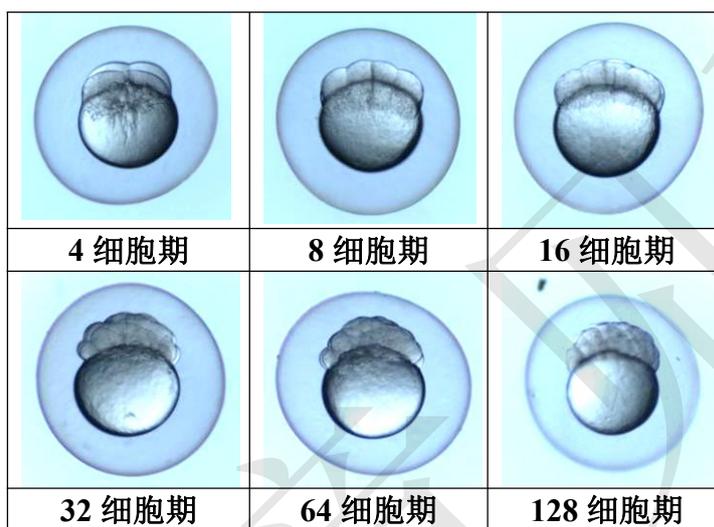


图 B.1 斑马鱼 4~128 细胞期胚胎代表性图片

附录 C

A法测试24孔板暴露设计图示

A法测试24孔板暴露设计见图C.1。

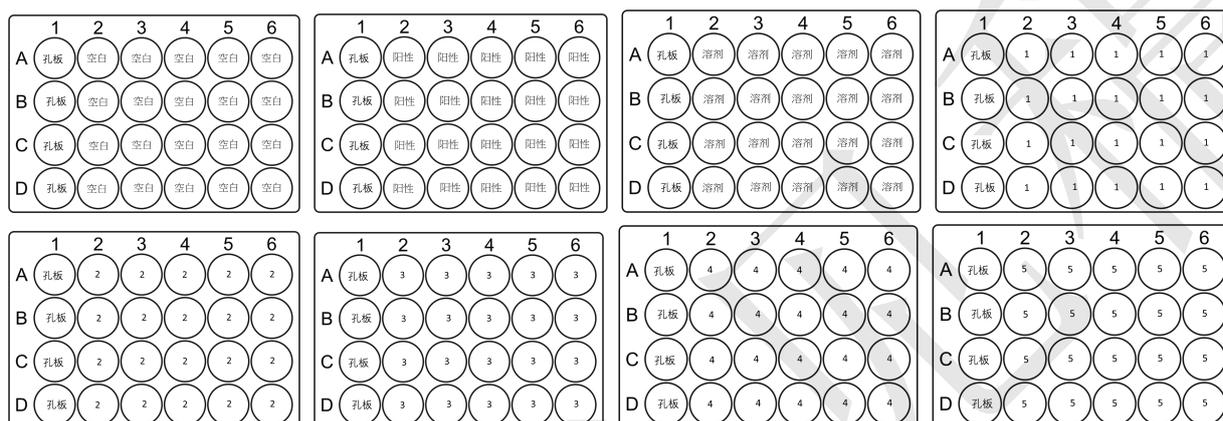


图 C.1 24 孔板暴露设计图

注：空白即空白对照组，孔板即孔板对照组，阳性即阳性对照组，溶剂为溶剂对照组，1~5为样本 5 个测试浓度。

B法测试96孔板暴露设计图示

B法测试96孔板暴露设计见图C.2。

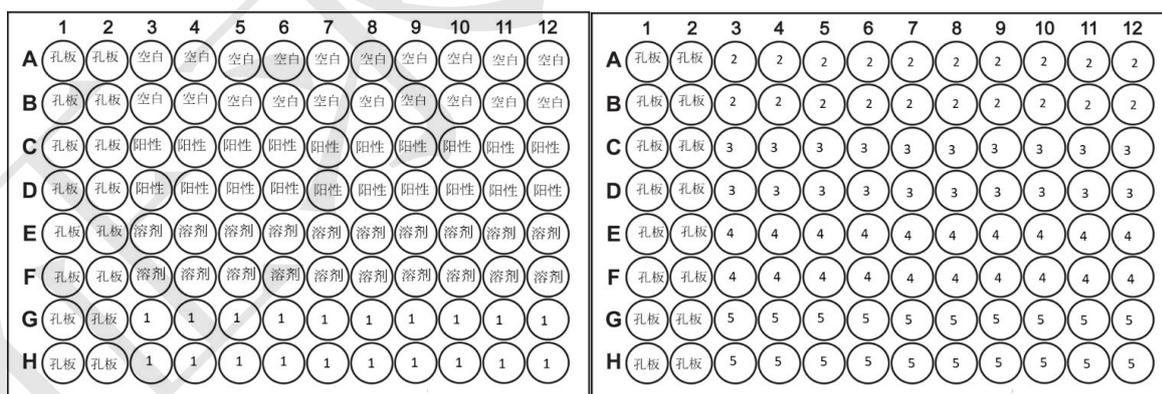


图 C.2 96 孔板暴露设计图

注：空白即空白对照组，孔板即孔板对照组，阳性即阳性对照组，溶剂为溶剂对照组，1~5为样本 5 个测试浓度。

附录 D

A法测试结果中正常及判定为死亡的斑马鱼胚胎图示

B法测试结果中正常及判定为死亡的斑马鱼胚胎见图D.1。

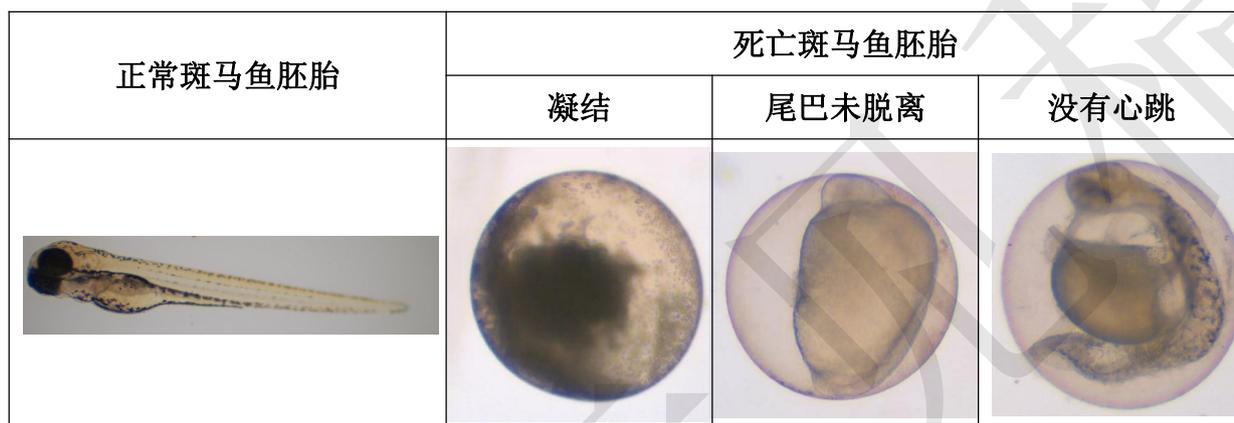


图 D.1 测试结果代表性图片

B法测试结果中正常及判定为死亡的斑马鱼胚胎图示

B法测试结果中正常及判定为死亡的斑马鱼胚胎见图D.2。

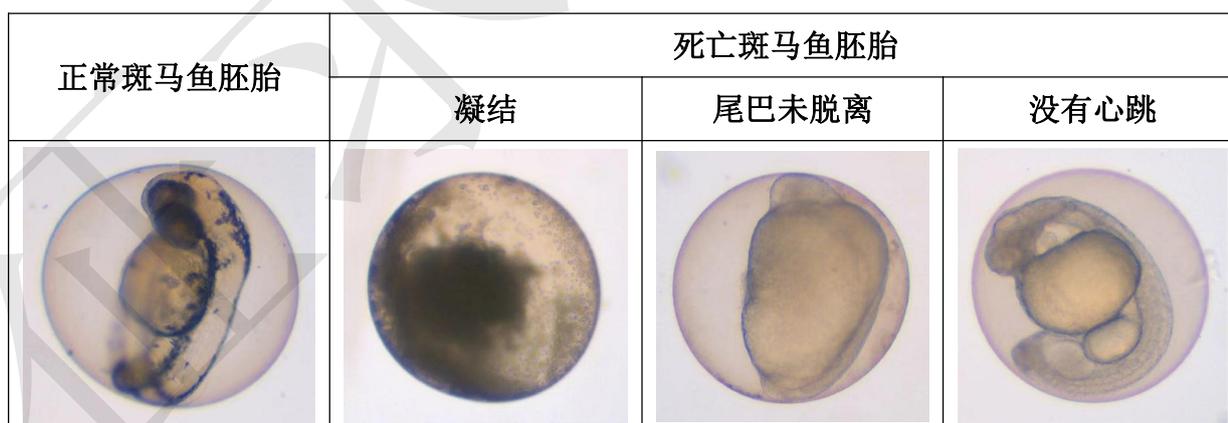


图 D.2 测试结果代表性图片

附录 E

半数致死浓度(LC₅₀)计算方法—概率单位法

A法测试卡马西平结果见表E.1

测试浓度 (mg/L)	浓度对数 $x = \lg(\text{测试浓度})$	斑马鱼胚胎死亡率 (%)	概率单位 y
30.5	1.48	5	3.36
48.8	1.69	25	4.33
78.1	1.89	65	5.39
125	2.10	75	5.67
200	2.30	95	6.64

表 E.1 A 法测试卡马西平结果

应用概率单位法进行剂量反应曲线拟合见图 E.1

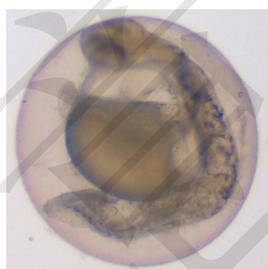


图 E.1 应用概率单位法对卡马西平 A 法测试结果进行剂量反应曲线拟合

回归方程 $y = a + bx = -2.2716 + 3.8827x$; y 为概率单位, x 为浓度对数。

LC₅₀ 的概率单位 (y) = 5, 计算当 $y = 5$ 时, $x = \lg(\text{LC}_{50}) = 1.87$

$$\text{LC}_{50} = 74.6 \text{ mg/L}$$

95%置信区间对数为 $(\lg \text{LC}_{50} - 1.96S/\sqrt{N/2}, \lg \text{LC}_{50} + 1.96S/\sqrt{N/2})$

$S = 1/b$, N 为概率单位 4~6 范围内各组受试鱼胚胎数之和。

95%置信区间的对数值为 60.35 ~ 92.25 mg/L。

附录 F

斑马鱼胚胎急性毒性 (LC₅₀) 分级表E.1 斑马鱼胚胎急性毒性 (LC₅₀) 分级。

级别	斑马鱼胚胎
	LC ₅₀ (mg/L)
实际无毒	>1 000
低毒	101 ~ 1 000
中毒	10 ~ 100
高毒	<10