

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

# 团 体 标 准

T/XXX XXXX—XXXX

## 化妆品 修复功效的测定 斑马鱼胚法

Cosmetics-Determination of tissue repair -Zebrafish (Danio rerio) embryo assay  
(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

全国城市工业品贸易中心联合会 发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 方法原理 .....	1
5 材料试剂 .....	1
6 实验步骤 .....	3
7 结果计算 .....	4
8 质量控制 .....	4
9 安全要求 .....	4
10 废弃物处置 .....	4
附录 A (资料性附录) 产卵盒参考示意图 .....	5
附录 B (资料性附录) 化妆品及原料前处理参考方法 .....	6
附录 C (资料性附录) 数据记录表 .....	7

## 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国城市工业品贸易中心联合会提出并归口。

本文件主要起草单位：

本文件参与起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

# 化妆品 修复功效的测定 斑马鱼胚法

## 1 范围

本标准规定了化妆品 修复功效的测定 斑马鱼胚法的术语定义、方法原理、材料试剂、实验步骤、结果计算、质量控制、安全要求、废弃物处置。

本标准适用于使用斑马鱼胚法的化妆品及化妆品原料修复功效测定评价。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 37625-2019 化妆品检验规则

GB/T 7918.1-1987 化妆品微生物标准检验方法 总则

OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

化妆品安全技术规范（2015版）

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 斑马鱼受精后小时数 Hp<sub>f</sub>

即“Hp<sub>f</sub>”。指斑马鱼受精后小时数。在光照的刺激下，雌雄斑马鱼在水中发生追尾行为，随后雌性斑马鱼会释放卵子到水体中，雄性斑马鱼会释放精子到水体中，精子和卵子结合形成受精卵。随后受精卵会逐渐发育，经历受精卵期、卵裂期、囊胚期、原肠胚期、体节期、咽部期、孵化期7个阶段发育形成斑马鱼胚胎。

### 3.2

#### 组织修复 Tissue repair

局部组织、细胞因致病因素导致损伤和死亡后，由邻近健康细胞再生来修补顶替，以恢复组织完整性的过程。

## 4 方法原理

4.1 局部组织、细胞因致病因素导致损伤和死亡后，由邻近健康细胞再生来修补顶替，以恢复组织完整性。

4.2 研究表明，斑马鱼的视网膜、脊髓、肾脏、心脏和鱼鳍拥有强大的再生能力，鳍再生是研究组织修复的一种特别有效的模型。在鱼鳍切断后的几个小时内，斑马鱼的鱼鳍会迅速再生，在剪鳍或损伤后，损伤的斑马鱼尾鳍结构能够很快恢复到原来的大小。

## 5 材料试剂

### 5.1 材料

### 5.1.1 斑马鱼交配盒

参考附录A。

### 5.1.2 胚胎收集器

参考附录A。

### 5.1.3 细胞培养板

96孔细胞培养板，每孔容积200.0  $\mu$ L。

### 5.1.4 离心管

容量为1.5 mL。

### 5.1.5 塑料滴管

容量为3.0 mL，长约150.0 mm。

## 5.2 试剂

### 5.2.1 二甲基亚砜

二甲基亚砜应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

### 5.2.2 氯化钾 (KCl)

氯化钾应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

### 5.2.3 氯化钙(CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O)

氯化钙应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

### 5.2.4 硫酸镁(MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)

硫酸镁应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

### 5.2.5 三卡因

三卡因应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

### 5.2.6 试验用水

应使用蒸馏水或去离子水。

### 5.2.7 注意

除非另有说明，分析时应使用符合GB/T 37625 化妆品检验规则、GB/T 7918.1 化妆品微生物标准检验方法 总则的分析纯试剂。

## 5.3 仪器

### 5.3.1 斑马鱼养殖系统

- a) 包括制水、储水、供水、排水及水循环系统；
- b) 制水：超纯水机，KD-P20-B；
- c) 储水：自动补水装置，定制；
- d) 供水，排水及水循环系统：独立式五层单排斑马鱼养殖单元，Z-A-S5。

### 5.3.2 pH计

测量范围0~14，最小分度为0.01 pH单位。

### 5.3.3 连续变倍体视显微镜

连续变倍体视显微镜型号为SZ681。

### 5.3.4 离心机

离心机型号为S1010E，塞洛捷克SCIOLOGEX。

### 5.3.5 电子天平

电子天平精度为0.1 mg，型号为PRACTUM224-1CN。

### 5.3.6 冰箱：

- a) 冷藏室 2℃~8℃；
- b) 冰冻室≤-18℃。

### 5.3.7 温度计

温度为0℃~50℃。

### 5.3.8 全波长酶标仪

型号为Multiskan™ G0。

### 5.3.9 高精度加样器及枪头

范围为0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、100 μL~1000 μL、1000 μL~5000 μL。

### 5.3.10 玻璃培养皿

100.0 mm培养皿。

## 5.4 溶液配制

### 5.4.1 标准稀释水

- a) 精密称取 17.2000 g 氯化钠，0.7600 g 氯化钾，2.9000 g 氯化钙，4.9000 g 硫酸镁，用蒸馏水或去离子水溶解并定容至 1000 mL。
- b) 取以上标准稀释水储备液 16.67 mL，再用蒸馏水或去离子水稀释定容至 1000 mL。

### 5.4.2 样品溶液：

精密称取或量取要配制相应浓度的样品，并用标准稀释水稀释配制成10.0 mL。

## 5.5 实验分组

### 5.5.1 空白对照组

标准稀释水。

### 5.5.2 样品组

不同浓度的样品溶液 bnbno。

## 6 实验步骤

### 6.1 实验胚胎的准备

6.1.1 斑马鱼配种时，产卵盒外缸预先加入 2/3 的养殖水，接着套入带有胚胎分离作用的内缸，插入挡板，隔开雌雄两鱼。于实验前一天晚上选取性成熟的待配种斑马鱼按照雌雄比为 1: 1 或 1: 2 置于带

有挡板的产卵盒中过夜，避光。

6.1.2 次日早晨打开光源，抽出产卵盒的挡板使之进行交配产卵。交配 1 h 后，检查各缸成鱼产卵情况，用漏网勺收集斑马鱼交配产生的胚胎，养殖水冲洗置 100.0 mm 培养皿中，平均每个培养皿胚胎数量不超过 300 枚。清除培养皿中的异物后，放入生化培养箱里孵育。

## 6.2 样品前处理

参考附录 B 化妆品及原料前处理方法。

## 6.3 实验方法

6.3.1 实验设置空白对照组、不同浓度样品组，每组 16 尾。

6.3.2 体式显微镜下挑选发育正常的 72 hpf 野生型斑马鱼胚胎，0.02%三卡因麻醉斑马鱼胚胎，用手术刀片切去大部分尾鳍，切除方向是与斑马鱼胚胎脊柱垂直，并将斑马鱼胚胎转移到载玻片上，体视显微镜下拍照记录斑马鱼尾鳍。

6.3.3 将切尾后的斑马鱼胚胎转移到 48 孔板中，每孔 1 尾，加入对应的实验溶液，每孔 500  $\mu$ L，置于 28 $^{\circ}$ C 生化培养箱孵育 48 h。

6.3.4 孵育 48 h 后，0.02%三卡因麻醉斑马鱼幼鱼，体视显微镜下拍照记录，并将斑马鱼胚胎转移到载玻片上，体视显微镜下拍照记录斑马鱼尾鳍。

6.3.5 用 Image J 测量切尾后和孵育 48 h 的斑马鱼尾鳍长度，并按照公式计算尾鳍再生增长率。

## 7 结果计算

按照公式计算斑马鱼尾鳍再生增长率：

$$\text{尾鳍再生增长率(\%)} = \frac{\text{Length 切尾48 h}}{\text{Length 切尾0 h}} \dots\dots\dots (1)$$

使用 GraphPad Prism 统计分析软件（或类似功能的其它工具）对各组别中斑马鱼尾鳍再生增长率进行统计分析，数值用均值  $\pm$  标准误（Mean  $\pm$  SEM）表示。

## 8 质量控制

阳性对照试验结果符合阳性对照组中斑马鱼弹性蛋白含量应高于空白对照组要求，结果方有效。否则，应查明原因后重新进行试验。

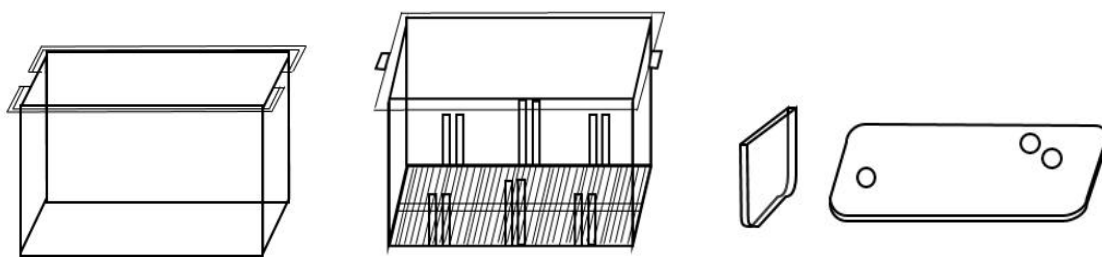
## 9 安全要求

安全要求应符合化妆品安全技术规范（2015版）。

## 10 废弃物处置

实验用斑马鱼胚胎于 2~8 $^{\circ}$ C 冰水中灭活处理后按一般废弃物处置。

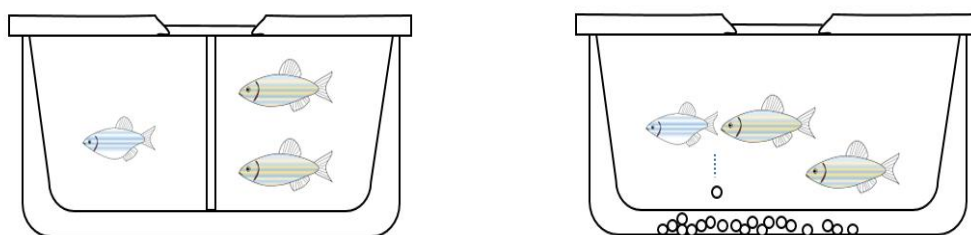
附录 A  
(资料性附录)  
产卵盒参考示意图



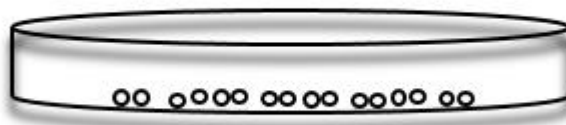
外缸：225\*115\*115 mm

内缸220\*110\*85 mm

挡板、外盖



斑马鱼配种



胚胎收集培养皿

**附 录 B**  
**(资料性附录)**  
**化妆品及原料前处理参考方法**

**D1. 水溶性样品前处理方法**

使用标准稀释水直接将受试样品倍比稀释（稀释比为2）成连续多个适当实验浓度，现配现用。

**D2. 非水溶性样品前处理方法**

取适量的二甲基亚砷将样品溶解，用蒸馏水或去离子水定容成一定浓度的受试样品储备液，再将受试样品储备液倍比稀释（稀释比为2）成连续多个适当实验浓度，现配现用。二甲基亚砷在实验溶液中的最终浓度 $\leq 1\%$ ，具体依据样品的溶解度而定。

附 录 C  
(资料性附录) 数据记录表

斑马鱼弹性蛋白酶联免疫吸附测定法实验记录表

样品名称			
试验时间	____年__月__日至 ____年__月__日		
数据呈现			
组别	斑马鱼弹性蛋白 OD 值		
空白对照组			
阳性对照组			
样品组 1			
样品组 2			
.....			
组别	斑马鱼弹性蛋白含量		p 值
空白对照组			
阳性对照组			
样品组 1			
样品组 2			
.....			
判定依据	空白对照组中弹性蛋白含量 为____	阳性对照组是否低于空白对照 组，且有显著性差异	是 否
	阳性对照组中弹性蛋白含量 为____	阳性对照组是否低于空白对照 组，且有显著性差异	是 否

试验人员\_\_\_\_\_

审核人员\_\_\_\_\_

