

附件1：

ICS 71.100.70

CCS Y40

T/FJCA

团体标准

T/FJCA 0 0 3 —2024

特殊食品和化妆品 脂质调节测试 秀丽线虫法

Special foods and cosmetics Lipid regulation test Caenorhabditiformis method

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

福建省特殊食品与化妆品协会 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。

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这些专利的责任。

本文件由福建上源生物科学技术有限公司提出。

本文件由福建省特殊食品与化妆品协会归口。

本文件起草单位：福建上源生物科学技术有限公司、安发（福建）生物科技有限公司、广州丸美生物技术有限公司、福建省食品药品质量检验研究院

本文件主要起草人：



特殊食品和化妆品 脂质调节测试 秀丽线虫法

1 范围

本文件规定了运用秀丽线虫（以下简称“线虫”）评价特殊食品和化妆品脂质调节测试的方法。
本文件适用于特殊食品和化妆品脂质调节功能的测试，特殊食品和化妆品的原料可参考本方法。

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。

DB35/T 2132—2023 实验用秀丽隐杆线虫 饲养技术

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 线虫生命周期 LifeCycle of *C.elegans*

20℃标准实验条件下，线虫从受精卵发育为成虫仅需84h左右，途中经历14 h的胚胎发育期，而后分别在受精后大约第26 h、33 h、41 h、51 h进行连续的几次蜕皮，经过L1期、L2期、L3期、L4期四个幼虫阶段发育为成虫。在L4期蜕皮后约12 h，进入产卵生殖期。在生殖期之后，线虫可以再存活14 d~21 d。见附录A。

3.2 大肠埃希氏菌 OP50 *Escherichia coli* OP50 (*E. coli* OP50)

尿嘧啶缺陷型大肠杆菌。

4 检测原理

油红O是一种脂溶性二唑染料，可与线虫的中性脂质和胆固醇酯特异性结合，使这些脂肪着色。线虫大部分脂肪储存在肠道和皮肤样的表皮细胞中，且由于线虫身体是透明的，因此可以通过观测油红O在线虫体内的着色水平来判断秀丽线虫脂肪含量，着色大/色深代表油脂含量越多。利用 Image J 软件处理线虫的油红着色样图即可对线虫体内脂肪累积和分布进行定量。

5 材料与试剂

5.1 材料

- 秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、尿嘧啶合成缺陷型大肠杆菌 (*Escherichia coli* OP50, *E. coli* OP50)
- 挑虫器
- 培养皿

5.2 试剂

除非另有说明，化学试剂使用符合国家标准的分析纯试剂。配制方法见附录B及DB35/T 2132—2023。

油红O (C₂₆H₂₄N₄O)、氯化钠 (NaCl)、氯化钙 (CaCl₂)、硫酸镁 (MgSO₄)、氯化钾 (KCl)、磷酸氢二钾 (K₂HPO₄)、磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)、二甲基亚砷 (DMSO)、无水乙醇、胆固醇、琼脂粉 (Agar)、LB肉汤、蛋白胨、异丙醇、Triton X-100、PBS缓冲液。

5.3 阳性对照品

奥利司他标准品 (Orlistat)，纯度 ≥98%，CAS: 96829-58-2

6 实验仪器与设备

- 体视显微镜，放大倍数在 5 倍~50 倍之间；
- 恒温培养箱，精度±1 °C；
- 洁净工作台；
- 万分之一天平，精度 0.1 mg；
- 高压灭菌锅；
- 高速离心机；
- 恒温摇床；
- 旋转混匀仪；
- 光学显微镜，物镜变倍不小于 10 倍。

7 实验步骤

7.1 实验准备

繁殖期 (4 d龄) 线虫，用于线虫的同期化。线虫的培养基维护应按照DB35/T 2132—2023的方法执行。

7.2 受试物

受试物包含特殊食品和化妆品及其原料。配制受试物测试溶液时，若受试物为水溶性物质，则使用无菌双蒸水作为溶剂，若受试物为非水溶性物质，可选用二甲基亚砷 (DMSO) 或纳米乳液等作为溶剂。针对不同受试物，需结合其特性调整前处理方法。

7.3 NGM 平板的制备

7.3.1 测试样品 NGM 的配制

测试样品NGM 的配制如下：

——水溶性样品：

- 空白对照组：用移液枪吸取150 μL的*E.coli* OP50菌液轻轻地打在NGM板的中央，避光晾干后封膜，4°C保存备用。
- 样品组：将受试样品溶解在无菌双蒸水中制成一定浓度的母液，取样品母液分别同熔融的NGM及*E.coli* OP50菌液按一定比例混合均匀，将含有一定浓度的NGM加入6cm培养皿中，待冷却凝固后，用移液枪吸取150 μL含有相对应样品浓度的*E.coli* OP50菌液打在NGM板的中央，避光晾干后封膜，4°C保存备用。

——非水溶性样品

- 空白对照组：取*E.coli* OP50菌液和样品溶剂按照和样品组同样的稀释比例混合均匀，用移液枪吸取150 μL的混合液打在NGM板的中央，避光晾干后封膜，4°C保存备用。
- 样品组：将受试样品溶解在DMSO或纳米乳剂中制成一定浓度的母液，取样品母液分别同熔融的NGM及*E.coli* OP50菌液按一定比例混合均匀，将含有一定浓度的NGM加入6cm培养皿中，待冷却凝固后，用移液枪吸取150 μL含有相对应样品浓度的*E.coli* OP50菌液打在NGM板的中央，避光晾干后封膜，4°C保存备用。

7.3.2 阳性对照组

阳性对照奥利司他组：用DMSO配制成6 mg/mL母液，取奥利司他母液分别同熔融的NGM及*E.coli* OP50菌液按999:1比例混合均匀，将奥利司他终浓度为6 μg/mL的NGM加入6cm培养皿中，待冷却凝固后，用移液枪吸取150 μL奥利司他终浓度为6 μg/mL的*E.coli* OP50菌液打在NGM板的中央，避光晾干后封膜，4℃保存备用。

8 实验方法

8.1 线虫同期化及测试实验

挑取L4时期的线虫转移至OP50-NGM培养皿中，每皿放置30~50只，在20℃培养箱培养2 d后（4 d龄），挑取20只至各实验NGM平板中，产卵1 h，而后将母虫尽数挑出。20℃培养3 d，最后收集培养好的线虫进行油红O染色。

8.2 油红O染色

用1.5 mL的PBST缓冲液将NGM板上的线虫冲洗转移至无菌2 mL离心管中，在2000 rpm转速下离心1 min，弃上清，加1.5 mL的PBST缓冲液冲洗线虫并在同样条件下离心2次，弃上清。加入600 μL的40%异丙醇，在旋转混匀仪中，30 rpm旋转3 min，弃上清，再加入600 μL的油红染液，在旋转混匀仪中，30 rpm旋转2 h。弃上清，加入600 μL的PBST缓冲液，在旋转混匀仪中，30 rpm旋转30 min，弃上清，余下50 μL含线虫的缓冲液，用于图像的拍摄及脂质的定量分析。

8.3 图像拍摄及脂质的定量分析

取10 μL待检的线虫缓冲液，滴加至载玻片中央，盖上盖玻片。在光学显微镜100×放大倍数下拍摄线虫图像，并使用ImageJ2软件对图像中线虫红色的脂质进行定量分析。实验设置3个平行，每个平行随机挑选至少10只线虫进行拍摄分析。

9 结果评价

9.1 统计学分析

采用ImageJ2软件对图像中线虫红色的脂质进行定量分析，得到总强度值（分析方法见附录C）。采用Graph Pad Prism 8软件绘制柱状图并分析t-test分析间差异， $P < 0.05$ 表示有显著性的差异。线虫体脂抑制率计算见公式。

$$IL = \left(1 - \frac{TI}{CI}\right) \times 100\% \quad \cdots \cdots (1)$$

式中：

IL——脂质抑制率（Inhibition Rate of Lipid）

CI——空白对照组平均总强度值（Intensity of Blank Control）

TI——样品组平均总强度值

9.2 结果判定及说明

在实验满足有效性的基础上，样品组线虫的总强度值显著低于空白对照组（ $P < 0.05$ ），说明样品在该浓度下具有减少线虫体内脂肪的能力。

在同一批次实验中，可以通过比较不同样品的线虫体脂抑制率来判定其减脂功效的强弱。

10 实验有效性的条件

10.1 样本量

最终用于脂质定量分析的单组实验线虫数量不少于30条。

10.2 孵化率

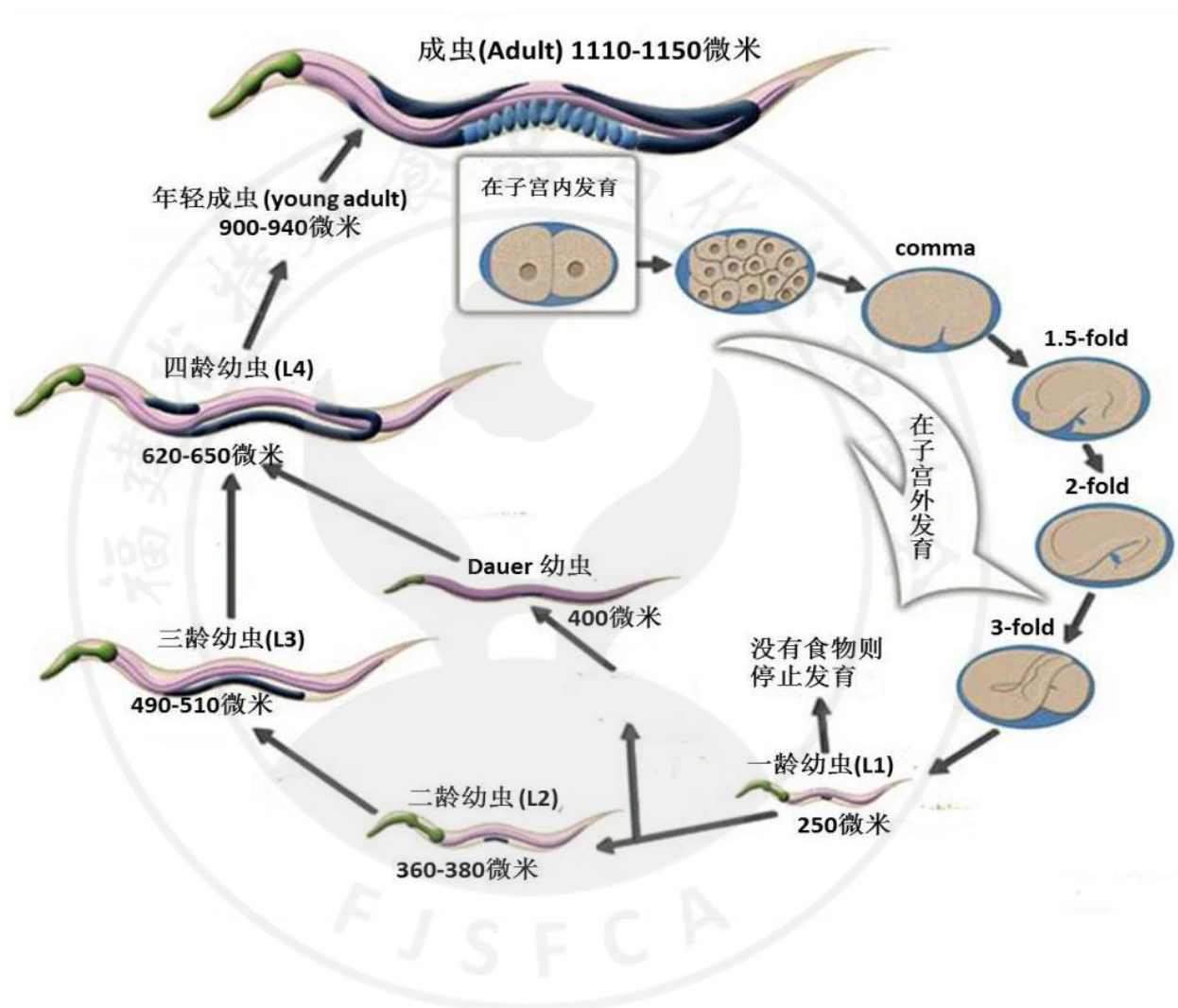
线虫的孵化率不低于95%。

10.3 阳性对照

奥利司他阳性对照组应与空白对照组应具有显著性差异（如附录D所示）。



附录 A
(资料性)
线虫生命周期



附 录 B
(资料性)
培养基及试剂配制

B.1 PBST 缓冲液

1×PBS缓冲液100 mL，10 μL的Triton X-100，混匀。

B.2 油红 O 染液

36 mg油红O加入18 mL异丙醇，混匀；再加入12 mL的双蒸水，混匀。



附录 C

(资料性)

ImageJ2 测定线虫红色脂质总强度的方法

ImageJ2 软件下载地址: <https://imagej.net/Fiji/Downloads>

- 1) 在 ImageJ2 软件中打开图像 (File – Open – Select File – Open) ;
- 2) 选择多边形工具 (菜单栏左至右第三个绘图工具), 在图像上完整地勾勒出线虫的轮廓, 点击窗口 Edit-Clear Outside
- 3) 调整颜色的阈值 (Image-Adjust-Color Threshold), 将 Color space 选择为 RGB 格式, 调节 Red 通道的亮度和对比度的值 (同一批次实验均采用此数值), 尽可能选中线虫的脂滴而不选中背景, 最后点击 Select (注: Dark background 选项不选);
- 4) 测量 (Analyze-Measure), 数值将显示在“Result”窗口, Integrated density 数值即为脂质总强度。



附 录 D
(资料性)
实验数据图表

线虫油红O染色图见图D. 1，线虫脂质相对强度的定量分析图见图D. 2。

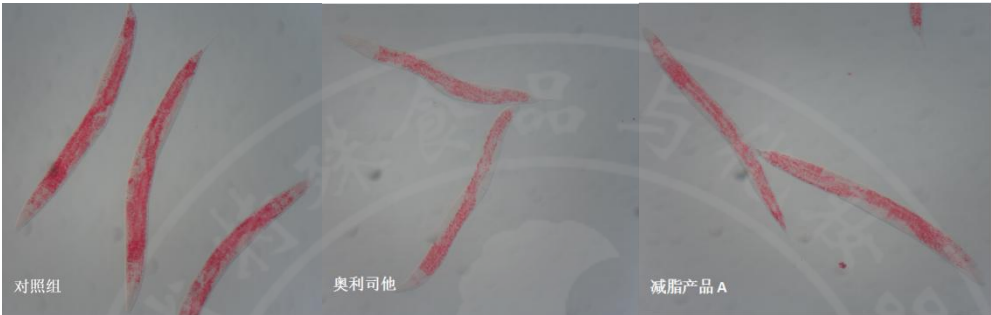


图 D. 1 线虫油红 O 染色图

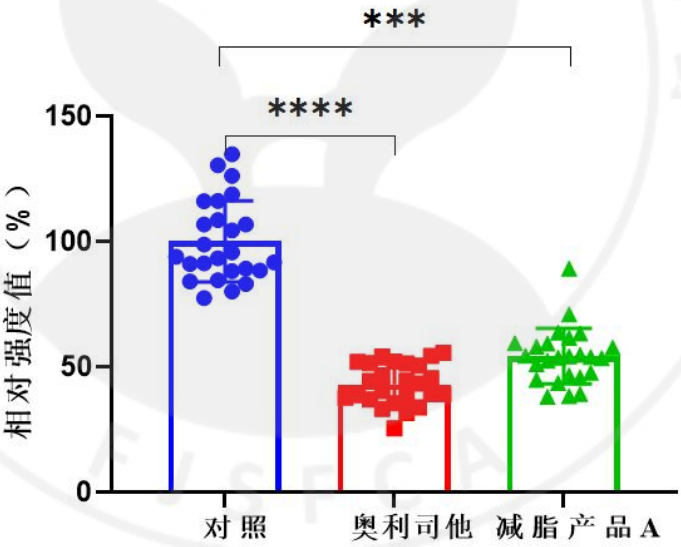


图 D. 2 线虫脂质相对强度的定量分析