

# 团 体 标 准

T/CMATB 11001—2021

---

## 禽肉的斑马鱼胚胎生物效应测试方法

Test method for the biological effect of zebrafish  
embryo on poultry meat

2021-12-24 发布

2022-03-24 实施

---

中国肉类协会 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有可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国肉类协会提出并归口。

本文件起草单位：山东新希望六和集团有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、中国肉类协会、中检科（北京）测试技术有限公司、青岛田润食品有限公司、杭州环特生物科技股份有限公司。

本文件主要起草人：刘继青、黄毅、邱静、周歌、孙海峰、田召志、王雅靖、荣佳、周倩、王维华、刘焯、王丽平、李超、郭胜亚、黄燕烽、彭逸、刘蕾、林佳、刘丽华、魏绍文。

# 禽肉的斑马鱼胚胎生物效应测试方法

## 1 范围

本文件规定了禽肉对斑马鱼胚胎生物效应的测试方法。

本文件适用于禽肉的生物安全性测定与评价。

## 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 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

OECD 236 OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**生物效应 biological effect**

禽肉对斑马鱼胚胎造成的卵凝结、体节未形成、尾部未分离及无心跳的影响。

### 3.2

**亲鱼 parent fish**

具有繁殖能力且用于繁殖的野生型AB品系成鱼，包括雄鱼和雌鱼。

### 3.3

**鱼胚胎 fish embryo**

指处于孵化前整个发育阶段的斑马鱼。

## 4 方法原理

将禽肉进行前处理后用恒温培养水稀释成一定浓度测试培养液，加入4-细胞期~128-细胞期斑马鱼胚胎中。在 $26\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养48 h，按照OECD 236判断斑马鱼胚胎存活情况。

## 5 试剂和材料

## 5.1 试剂

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

- 5.1.1 水，GB/T 6682，二级。
- 5.1.2 饱和正己烷。
- 5.1.3 氯化钠。
- 5.1.4 甲酸。
- 5.1.5 二甲基亚砜，色谱纯。
- 5.1.6 乙腈，色谱纯。
- 5.1.7 2%甲酸乙腈溶液：移取 2.0 mL 甲酸（5.1.4），用乙腈（5.1.6）稀释并定容到 100 mL。
- 5.1.8 恒温培养水：经过 5 天以上曝气处理并在恒温培养箱中保持水温在  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 5.2 受试生物

受试鱼胚胎培养方法按照附录 A 执行。

## 6 仪器和设备

- 6.1 pH 计：测量范围 0~14，最小分度为 0.1pH 单位。
- 6.2 倒置显微镜或体式显微镜：最小放大倍数为 32 x。
- 6.3 恒温培养箱：温度可调至  $26\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，精度  $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.4 旋转蒸发仪或氮吹仪。
- 6.5 斑马鱼养殖系统：包括净水、储水、供水、水质控制及循环等系统。
- 6.6 六孔细胞培养板。
- 6.7 产卵盒：惰性材料，推荐尺寸：20 cm×10 cm×11 cm，产卵盒材质应符合 GB 4806.7 的规定。
- 6.8 塑料滴管：5 mL，口径大于 3 mm。
- 6.9 一般实验室常用器皿和设备。

## 7 试料的制备与保存

### 7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的供试肌肉组织，绞碎，均质，作为供试试料。

### 7.2 试料的保存

供试试料（7.1）若不能直接称量，应在  $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中保存，并应在 24 h 内使用。供试试料（7.1）若超过 24 h 使用，应在  $\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中保存。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

称取试料 2.0 g（准确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 4 mL 乙腈溶液（5.1.6）涡旋振荡提取 5 min，于 4000 rpm/min 离心 5 min，上清液转入另一支 50 mL 离心管中，加入 4 mL 2%甲酸乙腈溶液（5.1.7）重复上述步骤提取一次，合并上清液，备用。

## 8.2 除脂

在离心管中加入 5 mL 饱和正己烷（5.1.2）和 0.5 g 氯化钠（5.1.3），涡旋 30 s 后于 4000 rpm/min 下离心 10 min，移去正己烷，将乙腈层提取液转入鸡心瓶或玻璃管中。

## 8.3 旋蒸

将鸡心瓶或玻璃管中的提取液于 40 °C 下使用旋转蒸发仪或氮吹仪（6.4）旋蒸至近干。

## 8.4 复溶液

加入 0.1 mL 二甲基亚砜（5.1.5）和 0.4 mL 蒸馏水复溶。

## 8.5 测试培养液

复溶液（8.4）与恒温培养水（5.1.8）按照 1:20 的比例混合。

## 8.6 测试

### 8.6.1 培养

取六孔细胞培养板（6.6），每孔加入测试培养液 3 mL 和 30 枚挑选后的 4-细胞期~128-细胞期（参见附录 A）斑马鱼胚胎。加盖后用锡纸密封包裹，放入恒温培养箱（6.3）培养 48 h。

### 8.6.2 空白对照

在六孔细胞培养板中加入 3 mL 恒温培养水（5.1.8）和 30 枚挑选后的胚胎，放入 26 °C ± 1 °C 恒温培养箱培养 48 h。

### 8.6.3 镜检

将六孔细胞培养板放到倒置显微镜或体式显微镜（6.2）下进行观察，统计斑马鱼胚胎存活数量。

斑马鱼卵凝结、体节未形成、尾部未分离及无心跳的 4 种生物效应分别描述如下（典型形态表现见附录 C）：

#### a) 卵凝结

凝结的鱼卵显微镜下内含物完全不透明，质地较硬。在肉眼观察下凝结的鱼卵呈不透明及灰暗的状态。

#### b) 体节未形成

鱼卵卵黄囊外侧胚胎中后部，无体节者为体节未形成。

#### c) 尾部未分离

正常发育的鱼卵，胚胎的尾部会伸长，与卵黄囊相分离。若无，则表明尾部未分离。

#### d) 无心跳

斑马鱼卵胚胎心脏位于卵黄囊与胚胎头部间，观测该区域是否有节律的震动，若 1 min 内无有节律的震动，则表明无心跳。

注：24 h 斑马鱼胚胎心脏刚形成，心跳非常微弱，不容易观察。观察应培养 48 h 后。

## 9 结果表示

9.1 根据斑马鱼胚胎 48 h 出现卵凝结、体节未形成、尾部未分离、无心跳的生物效应数量进行存活率（%）的计算。

$$\text{存活率 (\%)} = \frac{\text{初始鱼胚胎数} - \text{出现生物效应的鱼胚胎数}}{\text{初始鱼胚胎数}} \times 100\%$$

9.2 试验结果报告模版详见附录 C。

## 10 质量控制

### 10.1 空白对照

培养 24 h 后，空白对照鱼胚胎存活率  $\geq 90\%$ 。

### 10.2 精密度

本方法相对标准偏差  $\leq 20\%$ 。

## 11 干扰和消除

测试培养液中含有的不溶性颗粒物，可能影响实验结果，应避免吸取到不溶性颗粒物。

附录 A  
(规范性)  
斑马鱼胚胎培养方法

### A.1 亲鱼

在斑马鱼养殖系统中挑选养殖 6~18 个月，体长大于 3cm、健康无病且产胚胎量较高的野生型 AB 品系成鱼作为亲鱼。雌鱼要求近一周内没有交配产卵。为了提高斑马鱼的产卵量，需要提前一周将雌雄斑马鱼分开养殖。

### A.2 配鱼

交配前 12~16h，根据第二天的测试需要挑选一定数量发育良好的成年雌雄斑马鱼（雌雄比 1:1 或 2:1）移入繁殖盒中（每缸斑马鱼不得超过 2 对），用隔板将雌雄鱼分隔开培养，尽可能关闭一切噪音源，在此过程中保持 40dB~50dB 以下噪声值以及 26℃~28℃ 恒温条件。

### A.3 鱼卵 / 胚胎

上午 8:30 左右，在灯光开启 10 min 内将繁殖盒中的隔板取出，使雌雄斑马鱼在光照刺激下于繁殖盒内自由交配产卵，噪声值和温度依然保持原有的条件，于上午 10:30 左右收集繁殖盒中的受精卵。利用塑料滴管将产卵盒中的受精卵（呈半透明状）吸取出，在吸取过程中注意防止滴管将受精卵戳破。将受精卵移入培养皿，剔除发育异常的受精卵（包括死卵）以及杂质，利用恒温培养水冲洗 2~3 遍，之后于显微镜下挑选出发育正常且处于 4-细胞期~128-细胞期的胚胎，如图 A.1。若某个繁殖盒的鱼卵的受精率 < 70%，应弃用该繁殖盒的所有鱼卵。

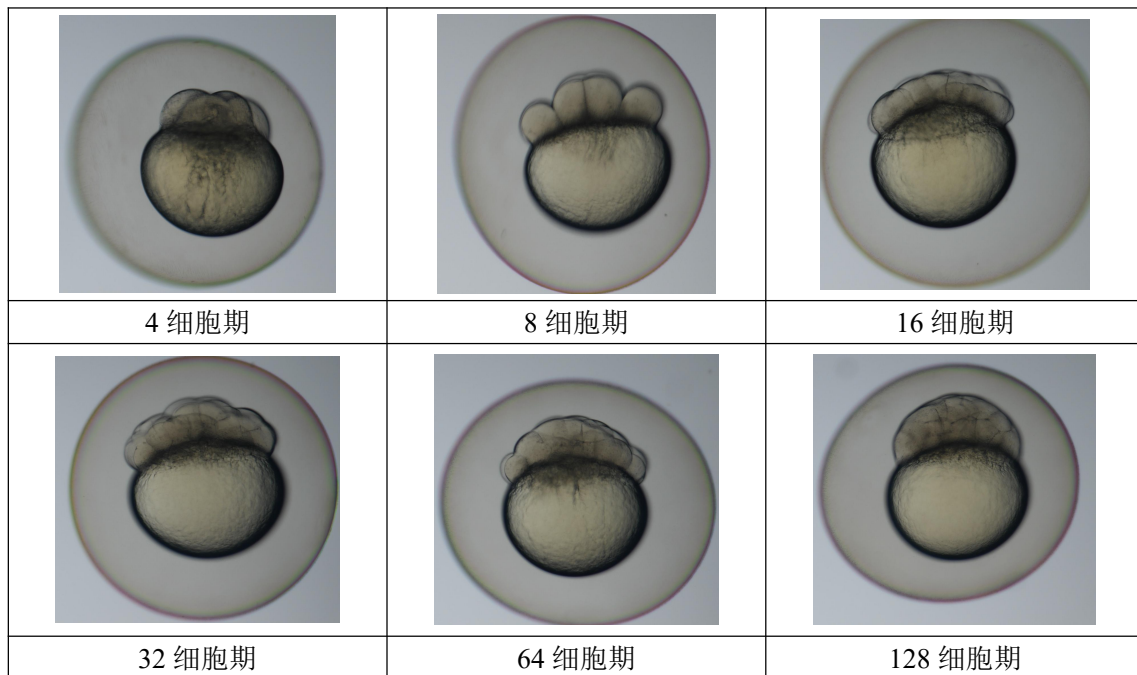
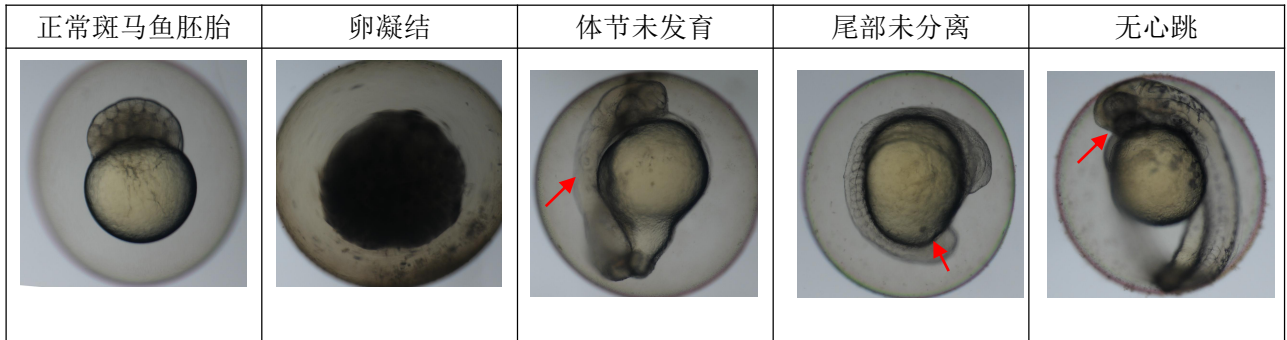


图 A.1 4-细胞期~128-细胞期的斑马鱼鱼卵

附录 B  
(资料性附录)

斑马鱼胚胎生物效应形态表现

斑马鱼胚胎生物效应形态表现如图 B.1 所示。



注：红色箭头表示观察部位

图B.1斑马鱼胚胎鉴别



附录C  
(资料性附录)  
试验结果报告模板

试验结果报告模板如表C.1所示。

表C.1 试验结果报告模板

样品名称		样品编号	
样品来源		样品状态	
送样时间		送样人	
保存条件		保存时间	
实验环境温度 (°C)		实验环境湿度 (RH%)	
称样量 (g)		稀释倍数	
样品前处理方法			
标准稀释水温度 (°C)		标准稀释水电导率 ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	
标准稀释水 pH 值		标准稀释水硬度 (mg/L $\text{CaCO}_3$ )	
检测结果			
24 h 胚胎存活数		存活率 (%)	
空白对照正常率 (%)		空白结果	
相对标准偏差 (%)			
畸形结果对比图			