

团 体 标 准

T/ZHCA

化妆品紧致功效测试-  
斑马鱼幼鱼弹性蛋白基因相对表达量  
测试方法

Firmness efficacy test of cosmetics - Test method for  
relative expression of elastin gene in zebrafish larvae  
(征求意见稿)

2021-##-##发布

2021-##-##实施

浙江省健康产品化妆品行业协会 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》给出的规则起草。

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。

本文件由杭州环特生物科技股份有限公司提出。

本文件由浙江省健康产品化妆品行业协会（ZHCA）归口。

本文件牵头单位：杭州环特生物科技股份有限公司

本文件主要起草单位：

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 化妆品紧致功效测试

## 斑马鱼幼鱼弹性蛋白基因相对表达量测试方法

### 1 范围

本文件规定了一种用于评价化妆品紧致功效的检测方法。

本文件适用于化妆品及其原料紧致功效的检测。

有以下特征的受试物不适用于本文件方法：受试物不能溶解于水或不能制备成能在水中均匀分散的悬浮液。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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 21808 化学品 鱼类延长毒性14天试验

### 3 术语及定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1

**最大耐受浓度** maximum tolerated concentration; MTC

以5 dpf的斑马鱼幼鱼未出现死亡（无心跳）和其他毒性效应（水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰、对机械刺激无反应等）的浓度。

#### 3.2

**受精后天数** day post-fertilization ; dpf

是指斑马鱼受精卵受精后的天数。

### 4 方法原理

弹性蛋白是皮肤组织中弹性纤维的主要成分，能为肌肤提供结构性支撑，让肌肤免受老化、松弛的困扰，对于维持组织的弹性和复原力至关重要。

弹性蛋白由二种类型的短肽段交替排列构成，*eln1*、*eln2*负责编码弹力蛋白不同的肽段，两个基因共同负责调控弹力蛋白的表达水平，使皮肤紧致，具有弹性。斑马鱼具有与人相似的弹性蛋白（*eln1*、*eln2*）基因。通过检测斑马鱼*eln1*、*eln2*基因相对表达量可表明受试物是否具有紧致功效。

### 5 材料和试剂。

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水，pH为6.5~8.5，电导率≤10μS/cm。

- 5.1 斑马鱼幼鱼，野生型AB品系斑马鱼的幼鱼。
- 5.2 标准稀释水，按附录A中描述的方法配制。
- 5.3 阳性对照样品：20 mg/mL的肌肽（L-Carnosine，CAS：305-84-0，纯度 $\geq 98\%$ ）
- 5.4 助溶剂：二甲亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO，CAS号，67-68-5，分析纯试剂）。
- 5.5 iTaq<sup>TM</sup> Universal SYBR Green Supermix（dsDNA荧光染料）。
- 5.6 FastQuant RT Kit（With gDNase）试剂盒（反转录试剂盒）
- 5.7 RNA-Quick Purification Kit（RNA快速提取试剂盒）。
- 5.8 引物序列： *$\beta$ -actin*：上游5' -TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3'，下游5' -CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3'；*eln1*：上游5' -AAAACCAGGTTACGGCTCTGT，下游5' -TCCTCCTGGATAAGCTCCGTATC；*eln2*：上游5' -CGGAACAGGAACTGGCATTAGG，下游5' -ACCACCAGGCCCAATTCC。

## 6 仪器和设备

- 6.1 生化培养箱：带有温控和进风装置，温度控制范围5℃~50℃，精度 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 。
- 6.2 电子天平：分度值为0.1 mg。
- 6.3 体视显微镜：自带白光光源，最小放大倍数为20倍。
- 6.4 高速冷冻离心机：17000 x g / 13300 rpm。
- 6.5 超微量紫外-可见分光光度计：用于测定RNA浓度和纯度。
- 6.6 普通PCR扩增仪：用于反转录。
- 6.7 荧光定量PCR仪：用于进行q-PCR定量检测。
- 6.8 一般实验室常用器皿何设备。

## 7 试验准备

### 7.1 受试物储备液制备

根据受试物的自身特性，用标准稀释水配制成一定浓度的受试物储备溶液，备用。

- 7.1.1 水溶性或易在水中分散的受试物：称取适量（0.01g~0.1g）受试物，用标准稀释水溶解并定容至10ml；
- 7.1.2 在水溶液中难于溶解或分散的受试物：称取适量（0.01g~0.1g）受试物，添加0.1ml助溶剂助溶，用标准稀释水溶解并定容至10ml。所有组别中的助溶剂浓度应该保持一致，且浓度（质量浓度或体积分数）不大于1%。同时，应加设溶剂对照组试验，溶剂对照组不能对斑马鱼的存活有明显或其它任何可观察到的不利影响，也不能对试验结果有显著性影响。

### 7.2 斑马鱼幼鱼准备

在体视显微镜下挑选足够数量的发育正常的斑马鱼幼鱼，置于标准稀释水中进行孵育，容器的水温控制在（28.5 $\pm$ 1.0）℃。

## 8 试验程序

### 8.1 预试验

预试验用于确定受试物的MTC，为正式试验的浓度设置提供参考。

#### 8.1.1 受试物稀释液制备

将受试物储备液用标准稀释水以2倍几何级数稀释至3~5个浓度系列，备用。

#### 8.1.2 受试物处理

选取发育正常的4 dpf的斑马鱼幼鱼，放入六孔板中，每孔30枚，在不伤害幼鱼的情况下除去6孔板中的标准稀释水，向每孔中迅速加入3 mL相应浓度的受试物溶液。

盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在 $(28.5 \pm 1.0)$  °C生化培养箱中避光孵育，孵育后24小时（5 dpf）后进行观察，对斑马鱼的死亡和其它毒性效应进行记录。

#### 8.1.3 MTC的确定

以5 dpf的斑马鱼幼鱼未出现死亡（无心跳）和其他毒性效应（水肿、躯干弯曲、肌肉纹理不清晰、对机械刺激无反应等）的浓度。

### 8.2 正式试验

#### 8.2.1 正式试验分组

按照以下方法进行分组：

- a) 空白对照组：含斑马鱼幼鱼及标准稀释水，每次试验设置一个空白对照组即可。
- b) 阳性对照组：含有阳性对照样品和斑马鱼幼鱼，根据需要，每次试验设置一个阳性对照组即可。
- c) 受试物测试组：含有受试物和斑马鱼幼鱼，受试物根据需要设置多个不同的浓度组。
- d) 溶剂对照组：含有助溶剂和斑马鱼幼鱼，如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则应设置该组。

#### 8.2.2 受试物处理

根据预试验的结果，确定正式试验的受试物浓度范围，试验最高浓度组不得高于MTC。根据测试需要，将受试物储备液用标准稀释水以2倍几何级数稀释至3~5个浓度系列。

选取发育正常的4 dpf斑马鱼幼鱼，并随机分配到六孔细胞培养板中，每孔30枚，在不伤害幼鱼的情况下除去六孔板中的标准稀释水，然后迅速向每孔中加入3ml相应浓度的受试物稀释液。每组试验设置3次重复。

充分混匀后，盖上培养板面板并用铝箔纸包裹，在 $(28.5 \pm 1.0)$  °C生化培养箱中避光孵育至终点（即5 dpf，孵育时间共计24小时）。

#### 8.2.4 收样及q-PCR

孵育结束后，将斑马鱼清洗干净转移至1.5 mL离心管，吸干鱼水保存在-80 °C条件下，备用。

用RNA快速提取试剂盒提取各组斑马鱼总RNA。利用超微量紫外-可见分光光度计对总RNA浓度和纯度

进行测定，使用反转录试剂盒在普通PCR扩增仪进行反转录，合成cDNA。利用dsDNA荧光染料进行点板后用荧光定量PCR仪检测 $\beta$ -actin和 $eln1$ 、 $eln2$ 的基因表达。

## 9 结果评价

### 9.1 数据处理

#### 9.1.1 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Mean  $\pm$  SE表示。使用SPSS软件对数据进行方差分析，以空白对照组（或溶剂对照组）作为标准，比较各实验组目的基因相对表达量， $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

#### 9.1.2 紧致功效的定量计算

根据各实验组 $\beta$ -actin和 $eln1$ 、 $eln2$ 的 $C(t)$ ，计算各浓度组受试物 $eln1$ 、 $eln2$ 的RNA相对表达量公式如下：

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$$

$$\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{空白对照组}} - \Delta C(t)_{\text{受试物测试组}}$$

$$\text{RNA相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$$

如果受试物配制过程中使用了助溶剂，则公式中的空白对照组数值用溶剂对照组数值进行替换。

## 9.2 结果判定及说明

在试验满足有效性的基础上，受试物与正常/溶剂对照相比， $eln1$ 、 $eln2$ 的RNA相对表达量显著增加（ $P < 0.05$ ），说明受试物在该浓度下具有增加弹性蛋白（ $eln1$ 、 $eln2$ ）基因相对表达量的能力，可作为紧致功效评价的证据支撑之一。

## 10 试验有效性的条件

**10.1** 预试验或正式试验中，空白对照组（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；

**10.2** 正式试验中，阳性对照组与空白对照组之间的RNA相对表达量存在统计学上的显著性差异，且平均值之差必须大于2倍的空白对照组组内标准偏差（SD），否则该次试验视为失败。

**10.3** 正式试验中，如果使用了助溶剂，溶剂对照组与空白对照组之间的RNA相对表达量不能存在统计学上的显著性差异，否则该次试验视为失败。

## 11 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面内容：

- a) 检验依据；
- b) 受试物和阳性对照的信息，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，包括试验具体步骤；
- e) 试验开始至完成的日期；
- f) 试验结果，包括测定数据、计算值、图像数据等；
- g) 数据处理与结果评价方法；
- h) 结论。

征求意见稿

## 附录 A

(规范性)

### 标准稀释水配制方法

#### A.1 试剂

除非另有说明，所用试剂均为分析纯。水为新制蒸馏水或去离子水，pH为6.5~8.5，电导率 $\leq 10\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

A.1.1 碳酸氢钠 $\text{NaHCO}_3$ ，CAS号：144-55-8）。

A.1.2 氯化钾（KCl，CAS号：7647-14-5）。

A.1.3 氯化钙（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，CAS号：10035-04-8）。

A.1.4 硫酸镁（ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，CAS号：10034-99-8）。

#### A.2 配制

##### A.2.1 标准稀释水储备液的配制

分别称取2.59 g碳酸氢钠，0.23 g氯化钾，11.76 g 二水合氯化钙，4.93 g 七水合硫酸镁用水溶解，定容至1L容量瓶，备用

##### A.2.2 标准稀释水的配制

吸取2.5ml标准稀释水储备液于100ml容量瓶，用水定容至刻度，摇匀备用。

#### 参 考 文 献

[1] Miao M , Bruce A E E , Bhanji T , et al. Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish[J]. Matrix Biology, 2007, 26(2):115-124.

---