ICS：71.100.70

Y40

团　　体　　标　　准

T/HPCIA 004-2021

化妆品 斑马鱼实验通用技术规范

Cosmetics Technical requirements of zebrafish research laboratory

（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同附上。

2022-XX-XX 发布　　2022-XX-XX 实施

广州开发区黄埔化妆品产业协会　发布

目录

前　言 3

化妆品 斑马鱼实验通用技术规范 4

1. 范围 4

2. 规范性引用文件 4

3. 术语和定义 4

4. 斑马鱼实验平台分区 4

5. 饲养区布局要求 4

6. 实验区设备设施要求 6

7. 饲育设施 7

8. 饲育环境条件 7

9. 饲育用水要求 7

10. 饲育密度与饵料饲喂 8

11 人员及维护 8

12 质量规范 9

广州开发区黄埔化妆品产业协会
HP
GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION

前　言

本标准是GB/T 1.1-2020给出规则起草。

本标准由广州开发区黄埔化妆品产业协会提出。

本标准由广州开发区黄埔化妆品产业协会归口。

本标准起草单位：广州保化斑马鱼检测技术有限公司、雅纯（广州）生物技术有限公司、广东悦颜妆生物科技有限公司、澳思美日用化工（广州）有限公司、泉后（广州）研究院生物科技有限公司、广东三好科技有限公司、完美（广东）日用品有限公司、广州市科能化妆品科研有限公司、伯德创研（广州）生物科技有限公司、广东悠质检测技术有限公司、赛谱检测科技（广州）有限公司、广州市络捷生物科技有限公司、广东省保化检测中心有限公司、暨南大学、广东工业大学、广东省人民医院。

本标准主要起草人：熊阳、常鲜耀、肖德凯、黄伟雄、韩志东、班育安、高业成、杨登亮、林启盛、李适炜、卢能湧、周锦珂、梅文杰、郭清泉、赵海山。

GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION

化妆品 斑马鱼实验通用技术规范

1. 范围

本文件规定了《化妆品 斑马鱼实验通用技术规范》的饲养区以及实验区应配备条件，以及实验室化妆品样品检测的通用技术规范，包括样品前处理方法等。

本文件适用于化妆品斑马鱼实验平台的搭建以及化妆品（膏霜、乳液、凝胶、精华，等）及化妆品原料的实验前处理。

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件

GB 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 18883 室内空气质量标准

DB32/T 3979-2021 实验用 斑马鱼 饲育技术条件

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于文件

3.1 Days post-fertilization（dpf）

受精后天数。

3.2 斑马鱼胚胎 zebrafish embryo

未出壳膜的斑马鱼胚胎，一般指 0 dpf~4 dpf 的斑马鱼胚胎

4. 斑马鱼实验平台分区

斑马鱼实验平台应具备饲养区与实验区，区域分区清晰，功能完备。

5. 饲养区布局要求

5.1 饲养鱼房设施设备装修要求

5.1.1 供电要求

1) 独立式斑马鱼养殖单元供电：220V（±5%），50Hz，1.2KW 电源 1 个，10A 插座，离地 2.2 米以上，带防溅盒。

2) 净水供水单元设备供电：220V（±5%），50Hz，1.2KW 电源 2 个，10A 插座，

离地 2.2 米以上，带防溅盒。

3) 空调插座：供电均不小于 16A，设漏电保护，特殊用途根据实验室设备确定。

4) 总供电要求：配电时应考虑用电平衡，空调供电、水体循环单元设备供电、插座供电，每一路供电安装独立的断路器。接地须符合国家标准，接地电阻小于 1Ω。

5.1.2 室内温度及换气

采用独立空调，通风采用独立新风排风（粗效过滤），新风排风加全热式换热器

饲养区安装独立冷暖空调，26℃±1℃，至少每 4 h~5 h 输入 1 次，每次空气交换量是整体空间的 2 倍体积。设新风排风，无尘净化，除湿（湿度应不大于 80%）。

5.1.2 给水、净水、排水

1) 水池设自来水管路、净水管路、水池排水。

2) 饲养区内设自来水管路，管径 DN40，供水量大于 5m³/h，水温 15-25℃，供水压力 0.1Mpa 至 0.4Mpa；接口设置阀门，预留 DN25 内螺纹。净水管路主管采用 DN25，支管为 DN15，接口设置阀门，预留 DN15 内螺纹，用水管到每个水斗。

3) 排水：设置 DN80 地漏，下水量不小于 8m³/h 且安装不少于一个地漏用于设备正常排水使用。

5.1.3 照明

实验室吊顶内安装防水日光灯，按照办公室照明强度要求确定安装数量，设定时开关独立控制，14 小时关，10 小时开自动时间控制，同时带旁通开关，可直接开关。

5.1.4 吊顶

为防潮吊顶，高度统一，最小高度 2400mm，其他房间无特殊要求。

5.1.5 地面

瓷砖或环氧自流平，做防水处理、防滑，地面坡向地漏。

5.1.6 墙面

1）隔墙为 50mm 双面彩钢板。其他墙面可用瓷砖或双面彩钢板。

2）养殖间外墙上的通风窗需全部封住。

5.1.7 房门

防潮门，单扇门净宽度不小于 900mm，高度为 2100mm。

5.1.8 消防与安全

1) 每个房间有烟感及自动喷淋消防措施，并将报警信号连接值班室。

2) 斑马鱼实验室应有防鼠害措施。

3) 装修材料使用防火阻燃材料

5.2 饲养区功能分区

包括去离子水制备区、饲育区、饵料生产区、储存区、清洁区、隔离区、循环系统流水处理区（如养殖单元采用集中循环系统，则需设置循环系统流水处理区）

5.2.1 去离子水制备区

将符合 GB 5749《生活饮用水卫生标准》要求的水进行反渗透处理制备成去离子水的区域，可位于饲养鱼房外独立空间。

5.2.2 饲育区

日常繁育斑马鱼的饲育区应配备流水以及静水饲育设施饲育不同阶段的鱼；

5.2.3 饵料生产区

培育丰年虫幼虫的区域，配置供孵化丰年虫卵的专用孵化设备。

5.2.4 清洁区

设有清洁用水池及鱼捞等渔具存放处

5.2.5 隔离区

用于病鱼及外来鱼种隔离使用。

6. 实验区

6.1 设备设施要求

实验区应与饲育区进行分区规划，实验室应具备常用设备有体视显微镜、恒温培养箱、桌面离心机、台式离心机等；在此基础上根据实验需求还应配有显微注射仪、荧光显微镜、分析天平等设备仪器。

进行实验处理的斑马鱼应饲育在独立于斑马鱼日常繁育饲育区外的实验区

6.2 实验样品前处理

6.2.1 水溶性样品

使用缓冲水能直接溶解的样品或在一定助溶剂条件下能溶解于水的样品，并将其制成在水中能完全溶解的溶液或均匀分散的混悬液。（例如水剂、粉剂等）

6.2.2 非水溶性样品

针对乳膏剂等剂型使用以下步骤进行样品前处理

1）称取 1.5~2.0 g 化妆品于培养皿中，置于 37℃温度条件下的烘箱内烘干 1~3 小时，除去化妆品中原有的水分；

2）将烧杯中剩余物质刮下，转移至离心管中，加入 1 ml 二氯甲烷，用涡旋仪涡旋

振荡至完全分散；

3）加入 4~7 mL 缓冲水，超声提取 20~30 分钟，涡旋振荡 1 分钟，得混合溶液；

4）将混合溶液于转速 10000~13000 rpm 下高速离心 5 分钟；

5）取上清液于培养皿中，于 37℃~60℃温度条件下的烘箱烘至剩余体积为 1~3 mL，即得到可用于斑马鱼模型功效评价的化妆品功效成分提取液。

针对精华油等类型使用以下步骤进行样品前处理

使用适合的助溶剂将其溶解成在水中能均与分散的混悬液用于使用。

7. 饲育设施

7.1 斑马鱼饲养单元

7.1.1 饲育架

应由不锈钢或其他防水防锈等无毒材料制成，层距不低于 2400mm。

7.1.2 饲育缸

材质要求无毒无害、无放射性、耐腐蚀、耐高温、耐高压、耐冲击、易清洗、易消毒灭菌等特点。饲育缸由饲育盖板、缸体与后插板组成；盖板设有饵料投喂孔、流水单管孔和备用孔；饲育缸体后配有卡槽，可插入防止幼鱼逃逸的后插板。

7.1.3 交配缸

内外胆结构，材料要求与饲育缸一致，并配有分离隔板和盖板。

8. 饲育环境条件

8.1 温度

水温适宜范围：24~30℃；鱼房室温范围：25~27℃；观察胚胎发育经典温度：28.5℃

8.2 空气

空气质量符合 GB/T 18883《室内空气质量标准》。另需有新风输入，至少每 4 h~5 h 输入 1 次，每次空气交换量是整体空间的 2 倍体积。

8.3 光周期和光照强度

光周期：14 h 光照和 10 h 黑暗；光照强度：54~324 lux

9. 饲育用水要求

9.1 PH

耐受范围：6.0~9.5；养殖范围：7.0~8.0

9.2 电导率

养殖范围：200—1700 μS/cm；最适范围：500—800 μS/cm 左右

广州开发区黄埔化妆品工业协会 HP GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION

9.3 氨氮

亚硝酸盐(Nitrite , NO2-): < 0.2 mg/L

硝酸态盐(Nitrate, NO3-): < 5 mg/L

总氨氮（NH4++NH3）：Un-ionized ammonia (NH3) < 0. 02 mg/L

9.4 盐度

一般范围：0. 25—0.50%

9.5 溶解氧

溶解氧(D.O2): 5—8 mg/L

9.6 二氧化碳

二氧化碳(CO2): < 5 mg/L

9.7 硬度

最适范围：75—200 mg/L 有利于斑马鱼生长

9.8 氯

氯(Chlorine): 0 mg/L

耐受范围较低（0.5-1ppm），不然会造成死亡

10. 饲育密度与饵料饲喂

10.1 饲育密度

胚胎要求 90mm 培养皿养殖密度最佳为 50 枚/皿，不宜超过 150 枚/皿；5~15 dpf 时期养殖密度一般为 50 尾/L，不超过 100 尾/L；16~30 dpf 时期养殖密度一般不超过 30 尾/L，每日投喂 2—3 次丰年虫；31~90 dpf 时期养殖密度一般不超过 10 尾/L，每日投喂 2—3 次丰年虫；成鱼（>90 dpf）养殖密度一般 5—8 尾/L，每日投喂 1—2 次丰年虫。

10.2 饲育饵料

斑马鱼饵料应包括开口食与成年饵料，开口食可选用饲料粉末和草履虫活体，成年饵料一般使用丰年虫幼虫活体（需要孵化），均可自行购买。

10.3 饲喂量

斑马鱼的饲喂次数为 2~4 次/日

11 人员及维护

11.1 饲育人员技能

斑马鱼生产与使用人员应在上岗前接受专业培训，了解斑马鱼繁殖生物学的基本知识、饲育规范以及使用与管理规范等。

广州开发区黄埔化妆品产业协会 HP GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION

11.2 生长记录

以每日、周、月为单位分别记录

每日观察并记录水温、室温、湿度、饲喂次数、清洁、整理、鱼缸清洗、受精卵收集以及病死鱼情况等

每日检查系统运行电压等参数是否符合系统运行的要求。

每日检查紫外灯是否正常工作。

每日检查系统 pH、温度、电导率及溶氧度是否在规定范围内。

每周检测养殖水中的氨氮、氯以及溶氧含量与 PH 并记录

每半个月更换消毒水并进行登记

每月更换过滤棉袋及清洗活性炭并进行登记

每 6 个月更换一次紫外灯灭菌灯管并进行登记

以上记录需进行集中存档

11.3 器具消毒

斑马鱼房常用器具需定期消毒灭菌。捕捞斑马鱼的渔具和收集受精卵的滤网需浸泡在消毒液中，使用前后用清水充分冲洗。使用完毕后放回消毒液中浸泡。消毒液需每周更换。玻璃器皿需定期高压灭菌。其它不适于高压灭菌的器皿，应使用消毒液消毒灭菌。斑马鱼房墙面和地面需每周使用消毒液清洗消毒。

斑马鱼房隔离养殖区的任何器具在未经消毒处理前不得带离该区域。在隔离养殖区收集的受精卵需经过消毒后方可转移至斑马鱼房内部养殖区养殖。

11.4 标识

粘贴在饲育缸或交配缸外的斑马鱼标签信息应包括：动物的受精日期、基因型和传代代数等内容。

12 质量规范

12.1 实验用斑马鱼来源

实验用斑马鱼的遗传背景应该明确。不应饲育遗传背景不明的斑马鱼；不应使用来源于宠物市场的斑马鱼。

12.2 胚胎的质量

应具备与发育时期具备一致的显微形态学特征（见附录）

12.3 成鱼的质量

12.3.1 外来鱼

对于外来鱼种进行放置于隔离区进行隔离处置，原则上要求终生不得进入鱼架循环系统，如有例外则需单独设立养殖单元进行养殖，不应于现有鱼系混养。

12.3.2 病鱼

对于已有明显生病现象的斑马鱼，通常要进行及时的安乐死，但若病鱼十分珍贵，可将病鱼转移至隔离区隔离观察治疗。

12.3.3 安乐死

在实验室中，由于 18 个月以上的斑马鱼开始老化，产卵减少，免疫力降低，容易感染细菌，或生长肿瘤，可及时的施以安乐死处理。常用的斑马鱼安乐死方法有 2 钟：高剂量麻醉法和冰浴法。

成年斑马鱼可以使用高剂量麻醉法。将成鱼浸入 5X 高浓度的 tricaine 溶液中，观察鱼鳃的活动。鱼在麻醉剂中会缓慢停止呼吸。鳃动停止后继续浸泡 10-15 分钟，以保证鱼已死亡。之后可按照生物医学实验垃圾处理。

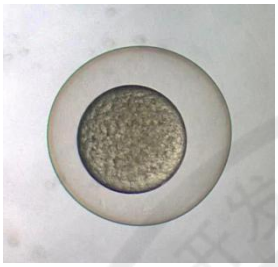
冰浴法可用于成年斑马鱼或 2 天以上的幼鱼。用于幼鱼时，将养殖有幼鱼的水和大量的冰充分混合 30 分钟后，可视为幼鱼已死亡。成年鱼可直接将鱼捞出，浸入冰水混合液中（保证有足够体积的冰）。鱼在冰水中心跳会逐渐放缓到彻底停止。冰浴浸泡 20 分钟以上，可视为鱼已死亡。之后可按照生物医学实验垃圾处理。

广州开发区黄埔化妆品业协会 GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION

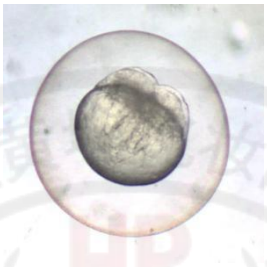
附录 A

（资料性附录）

斑马鱼胚胎发育阶段图

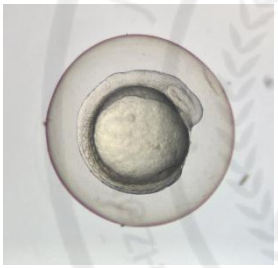


0hpf



1hpf

6hpf



12hpf

24hpf

48hpf

72hpf

附录 B

（资料性附录）

丰年虫孵化流程

1. 将气泵管从丰年虫孵化器中抽出，静置约 3 min；
2. 用喂鱼缸，将孵化器底部的丰年虫（红色）收集；
3. 使用白色过滤筛，用自来水冲洗丰年虫至下层滤网；
4. 使用纯水，将过滤筛下层的丰年虫收集；
5. 按照 500 mL 纯水、6.25 g 海盐、1.25 g 丰年虫卵的比例，加入孵化器漏斗中，气泵管一定要插至最底部，光照孵化 24 小时，供第二天使用；

广州市黄埔区黄埔化妆品产业协会
GUANGZHOU HUANGPU COSMETIC INDUSTRY ASSOCIATION