

广东省地方标准

DB44/T 2340.4—2021

诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价
第4部分：生殖毒性

Mugilogobius chulae—Toxicology evaluation—Part 4: Reproduction toxicity

地方标准信息服务平台

2021-10-18 发布

2022-01-18 实施

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 原理 2

5 方法 2

6 器材 3

7 评价步骤 3

8 质量控制 5

9 结果与报告 5

10 诸氏鲮虾虎鱼安乐死 6

11 实验室废弃物的处理 6

附录 A（资料性） 诸氏鲮虾虎鱼雌雄鉴别方法 7

附录 B（资料性） 诸氏鲮虾虎鱼生殖毒性评价原始记录表 8

附录 C（规范性） VTG mRNA 和 AR mRNA 相对表达量测定方法 16

地方标准信息服务平台

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。

DB44/T 2340《诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价》分为四个部分：

- 第1部分：急性毒性；
- 第2部分：摄食抑制；
- 第3部分：生长抑制；
- 第4部分：生殖毒性。

本文件是DB44/T 2340的第4部分。

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。

本文件由广东省科学技术厅提出并组织实施。

本文件由广东省实验动物标准化技术委员会（GD/TC 93）归口。

本文件起草单位：广东省实验动物监测所。

本文件主要起草人：李建军、黄韧、朱才毅、余露军、赖素群、林忠婷、陈小曲、曾进、蔡磊。

地方标准信息服务平台

诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价 第4部分：生殖毒性

1 范围

本文件规定了诸氏鲮虾虎鱼毒理学评价中生殖毒性的原理、方法、器材、评价步骤、质量控制、结果与报告、安乐死和实验室废弃物处理等要求。

本文件适用于直接或间接排入海洋、入海河口的污染物及受纳水体的生殖毒性评价。

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 35517-2017 化学品 鱼类生殖毒性短期试验方法

SN/T 3592 实验室化学药品和样品废弃物处理的标准指南

DB44/T 2340.1-2021 诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价 第1部分：急性毒性

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生殖毒性 reproductive toxicity

指外源物质对雄性和雌性生殖功能或能力以及对后代产生的不良效应。

3.2

卵黄蛋白原 vitellogenin, VTG

一种磷脂糖蛋白，卵黄蛋白的前体，通常存在于卵生动物性成熟雌性个体中。

[来源：GB/T 35517-2017，2.1.3，有修改]

3.3

雄激素受体 androgen receptor, AR

一种配体依赖性的反转录调节蛋白，介导脊椎动物雄激素的多向效应，对性别分化、性成熟和精子发生起重要作用。

3.4

最大耐受浓度 maximum tolerated concentration, MTC

受试物引起小于10%死亡率最高试验浓度。

[来源：GB/T 35517-2017，2.1.4]

3.5

无可见影响浓度 no observed effect concentration, NOEC

实验生物暴露在一组不同浓度的试验溶液一定时间后，通过观察实验生物的不良影响，并比较试验组与对照组统计分析结果，判定出对实验生物无显著影响（ $p>0.05$ ）的最大浓度。

[来源：GB/T 18420.2—2009，3.2]

3.6

最低可观察效应浓度 lowest observed effect concentration, LOEC

与对照相比,对受试生物产生显著($p < 0.05$)效应的最低受试物浓度。

[来源:GB/T 21828-2008, 2.4]

3.7

性腺指数 gonad somatic index, GSI

性腺重量相对去内脏体重的比例,是性成熟度的一个指标。

参见: $GSI = (G_w / S_w) \times 100\%$

式中:

G_w ——性腺重,单位为克(g);

S_w ——去内脏体重(净重),单位为克(g)。

3.8

相对生殖力 relative fecundity

指一尾雌鱼在一定产卵周期内单位体重或单位体长产出的卵子数量。

3.9

孵化率 hatching rate

从卵内破膜而出的仔鱼数量与总卵数的百分比。

3.10

不投饵存活系数 survival activity index, SAI

衡量仔鱼活力的重要指标。

参见: $SAI = \sum_{i=1}^K (N - h_i) \times i / N$

式中:

N ——起始的仔鱼数量;

K ——仔鱼全部死亡所需的天数;

H_i ——第*i*天时仔鱼的累计死亡数。

4 原理

VTG是包括性成熟鱼类在内的卵生雌性动物肝脏产生的一种特有蛋白前体,由血液循环进入卵巢,但在外源类雌激素物质的刺激下,雄鱼肝脏也能产生该蛋白前体;雄激素通过AR激活下游信号通路来行使其功能,外源类雄激素物质的暴露可诱导AR mRNA的表达。鱼类在污染物中暴露后,通过测定肝脏组织VTG mRNA和AR mRNA表达水平,可表征水污染物对鱼类的早期生殖毒性效应。此外,环境内分泌干扰物可通过干扰鱼类性激素水平进而导致鱼类性腺指数、生殖力、孵化率、不投饵存活系数等生殖器官发育和生殖能力指标异常,这些指标可用于评估受试物的生殖毒性。

5 方法

5.1 根据试液更换频次可分为静态毒性试验、半静态毒性试验和流水毒性试验。试验期间受试物实测浓度与配制浓度偏差超过20%或受试物稳定性不明确时,宜采用半静态毒性试验或流水毒性试验。

5.2 根据暴露时间可分为I期生殖毒性试验和II期生殖毒性试验。

5.2.1 I期生殖毒性试验:试验周期为21 d,以VTG mRNA和AR mRNA的表达量为主要检测指标。

5.2.2 II期生殖毒性试验：试验周期为90 d，其中包含持续暴露染毒期30 d，转移至清水饲养期60 d，以性腺指数、生殖力、孵化率、仔鱼不投饵存活系数作为主要检测指标。

6 器材

6.1 主要仪器设备

6.1.1 饲养诸氏鲮虾虎鱼以及饵料生物的养殖箱、水处理设备等。

6.1.2 测定环境因子的溶氧仪、盐度计、pH计、温度计等。

6.1.3 用化学惰性材料制成的试验容器。I期生殖毒性试验试验容器体积为2.0 L~3.0 L；II期生试验容器体积为5.0 L~10.0 L。

6.1.4 电子天平、高速搅拌器、高速台式冷冻离心机、荧光定量PCR仪、生物显微镜、解剖镜、血球计数板、超净工作台、量筒、胶头滴管、移液管、手抄网等。

6.2 诸氏鲮虾虎鱼

6.2.1 性别、规格选择

根据试验要求选择雌雄鱼。诸氏鲮虾虎鱼雌雄鉴别方法见附录A。

I期生殖毒性试验应选择在水温 $25.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、其它条件适宜的环境下培育的 (16 ± 2) 周龄雄鱼，其个体体长宜在平均体长的 $\pm 20\%$ 内。

II期生殖毒性试验应选择在水温 $25.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、其它条件适宜的环境下培育的 (22 ± 2) 周龄实验鱼，其个体体长宜在平均体长的 $\pm 20\%$ 内。

6.2.2 质量

按DB44/T 2340.1-2021中6.2.1的规定执行。

6.3 受试物

按DB44/T 2340.1-2021中6.3的规定执行。

7 评价步骤

7.1 样品准备

7.1.1 稀释水

按DB44/T 2340.1-2021中7.1.1的规定执行。

7.1.2 贮备液配制

按DB44/T 2340.1-2021中7.1.2的规定执行。

7.2 预试验

可采用较大的等比系数设置5个等比浓度组和1个阴性对照组。若使用助溶剂应增设助溶剂对照组，助溶剂的浓度应与试验组中助溶剂的最高浓度一致，试验溶液中助溶剂的最高浓度不得超过0.1%。可

不设平行组。应记录试验溶液配制过程，试验溶液配制原始记录表见附录B中表B.1。观察诸氏鲮虾虎鱼96 h的死亡情况，确定诸氏鲮虾虎鱼的最大耐受浓度（MTC）范围。

7.3 正式试验

7.3.1 试验溶液配制

I期生殖毒性试验：根据预试验结果，以0.1 MTC为最高试验浓度设定至少3个等比浓度组，等比系数3~10之间，并设阴性对照组、0.1 μg/L 17β-雌二醇阳性对照组和0.1 μg/L α-甲基睾酮阳性对照组。每个容器试液体积1.0 L。各试验组设3个平行。

II期生殖毒性试验：参考I期生殖毒性试验结果，设定至少3个等比浓度组，等比系数3~10之间，设阴性对照组、0.1 μg/L 17β-雌二醇阳性对照组和0.1 μg/L α-甲基睾酮阳性对照组。每个容器试液体积3.0 L~6.0 L。各试验组设2个平行。

若使用助溶剂应增设助溶剂对照组，助溶剂浓度应与试验组中助溶剂最高浓度一致，试验溶液中助溶剂的最高浓度不得超过0.1%。

应记录试验溶液配制过程，试验溶液配制原始记录表见附录B中表B.1。

7.3.2 诸氏鲮虾虎鱼移入

试验开始前诸氏鲮虾虎鱼停食5 h~24 h，用手抄网在驯养箱中随机捞取，移入试验容器。

I期生殖毒性试验每个容器放雄鱼5尾。II期生殖毒性试验每个容器放雌雄鱼各10尾。

在30 min内完成实验鱼分放。

7.3.3 试验环境条件

按DB44/T 2340.1-2021中7.4.3的规定执行。

7.3.4 诸氏鲮虾虎鱼投喂

每天每尾鱼投喂卤虫约30个，每个试验容器每次投喂体积不超过0.2 mL。

7.3.5 试验溶液更换

静态毒性试验不更换试验溶液。

半静态毒性试验每48 h至少更换一次试液，每次更换量不少于原试液体积的3/4。宜采用虹吸方式吸出原液，缓慢加入新液，操作过程中应避免触碰诸氏鲮虾虎鱼。

流水毒性试验每24 h至少更换一次贮备液。一个试验容器24 h的流量至少为该容器内试验溶液体积的5倍。试验期间流速变幅不大于10%。

7.4 观察和记录

7.4.1 水质因子测定和行为、体表特征观察

试验溶液加入前和试验结束时分别测量溶解氧、pH值、盐度等水质因子，每天测量水温、观察诸氏鲮虾虎鱼死亡、游泳、呼吸、摄食、体色、身体弯曲、鳞片脱落等异常情况，及时移出死亡个体。观测结果记录于原始记录表中，见附录B中的表B.2。

7.4.2 VTG mRNA 和 AR mRNA 相对表达量

I 期生殖毒性试验结束时,采集同一试验容器内所有存活的诸氏鲮虾虎鱼肝脏组织混合为一个样品,液氮中保存。3个平行组为3个生物学重复样品。

肝脏组织取样按GB/T 35517的规定执行。

按附录C的方法测定各样品VTG mRNA和AR mRNA相对表达量,测定结果分别记录于附录B中的表B.3和表B.4。

7.4.3 性腺指数

II 期生殖毒性试验结束时,100 mg/L MS-222麻醉实验鱼,逐一称量性腺(精巢或卵巢)重量和实验鱼净重(去内脏体重),结果记录于原始记录表中,见附录B中的表B.5。

7.4.4 生殖力

II 期生殖毒性试验转移至清水饲养期间每天观察诸氏鲮虾虎鱼产卵情况。雌鱼产卵后,计数产卵量,测量雌鱼体长,结果记录于原始记录表中,见表B.6。

7.4.5 孵化率

II 期生殖毒性试验转移至清水饲养期间,每批鱼卵产出后,置于稀释水中,在水温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照 $54\text{ lx}\sim 524\text{ lx}$ 、溶氧大于 5 mg/L 的条件下孵化,观察孵出鱼苗数,测定试验期间测定水质,观测结果记录于原始记录表中,见表B.7。

7.4.6 不投饵存活系数

II 期生殖毒性试验转移至清水饲养期间,每批仔鱼孵出后,随机取100尾初孵仔鱼(出膜2小时内),在DB44/T 2340.1-2021 B.2环境条件下不投饵饲养,测定试验开始和结束的水质环境因子,并每天观察仔鱼的存活数,直至仔鱼全部死亡。试验结果记录于原始记录表中,见表B.8。计算不投饵存活系数SAI值及半数致死时间。

8 质量控制

有效的试验应符合以下条件:

- 试验结束时,对照组(包括阴性对照组、溶剂对照组)诸氏鲮虾虎鱼死亡率不大于10%;
- 在 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下,与阴性对照组相比, $0.1\text{ }\mu\text{g/L}$ 的 17β -雌二醇阳性对照组暴露21 d后,雄性诸氏鲮虾虎鱼肝脏VTG mRNA相对表达量显著提高($p\leq 0.05$); $0.1\text{ }\mu\text{g/L}$ 的 α -甲基睾酮阳性对照组暴露21 d后,雄性诸氏鲮虾虎鱼肝脏AR mRNA相对表达量显著提高($p\leq 0.05$);II 期生殖毒性试验对照组产卵次数低于2次占比不超过50%;
- 原始记录应完整,包括样品名称、编号、试验时间、评价依据、驯养记录等。

9 结果与报告

9.1 结果计算

应对阳性对照组和阴性对照组、试验组和阴性对照组之间的生殖毒性效应进行比较分析,计算NOEC或LOEC。如使用了溶剂对照,应比较分析阴性对照组和溶剂对照组之间的毒性效应显著性差异。

采用Shapiro-Wilk法和Bartlett's法对试验结果进行正态分布和方差齐次检验。如果试验结果符合正态分布和方差齐次检验，则采用单因素方差分析（ANOVA）或多重比较分析（Dunnett's法），判定阴性对照组和不同浓度组之间是否存在显著性差异，确定NOEC或LOEC；如果试验结果不符合正态分布或方差齐次检验，则采用非参数方法（Jonckheere法）确定NOEC或LOEC。

9.2 评价报告

评价报告应包括以下内容：

- a) 受试样品的名称、来源、保存方法、保存时间等；
- b) 诸氏鲮虾虎鱼来源、体长、驯养和配对情况；
- c) 试验条件：
 - 1) 试验方式，如半静态毒性试验或流水毒性试验，以及曝气、密度等；
 - 2) 贮备液和试验溶液配制方法、浓度；
 - 3) 各试验容器诸氏鲮虾虎鱼的数量；
 - 4) 试验溶液配制后和试验结束时的环境指标，如水温、溶氧、盐度、pH等。
- d) 结果：
 - 1) 对照组和各浓度组诸氏鲮虾虎鱼的死亡率；
 - 2) 试验期间，受试物对诸氏鲮虾虎鱼的毒性效应（行为和体表特征等）；
 - 3) 阳性对照和阴性对照 21 d 的 VTG mRNA 和 AR mRNA 相对表达量显著性分析结果；
 - 4) 试验组与阴性对照 21 d 的 VTG mRNA 和 AR mRNA 相对表达量显著性分析结果，NOEC 或 LOEC 及其计算方法；
 - 5) 阳性对照和阴性对照 90 d 的性腺指数、生殖力、孵化率、不投饵存活系数显著性分析结果；
 - 6) 试验期间，可能会影响试验结果的因素。

10 诸氏鲮虾虎鱼安乐死

按照DB44/T 2340.1-2021第10章的规定执行。

11 实验室废弃物的处理

实验室样品及废弃物按SN/T 3592的规定执行。

附录 A
(资料性)
诸氏鲮虾虎鱼雌雄鉴别方法

A.1 形态特征

诸氏鲮虾虎鱼雄鱼和雌鱼形态特征比较见表A.1。

表A.1 诸氏鲮虾虎鱼雄鱼和雌鱼形态特征比较

雄鱼	雌鱼
头略平扁、中大，腹部扁平。	头稍钝圆，腹部膨大。
第一背鳍第2根~4根鳍棘末端延长呈丝状，最长鳍棘可延伸至第二背鳍第五鳍条基部。	第一背鳍第2根~4根鳍棘末端延长呈丝状，最长鳍棘仅延伸至第二背鳍第一鳍条基部。
上颌骨延伸至瞳孔中心的垂直线。	上颌骨延伸至眼眶前缘的垂直线。
成熟个体胸鳍基部有一个棕黑色斑点，斑点外边界呈黄色	成熟个体胸鳍基部有一个棕黑色斑点，斑点外边界呈灰白色。
尾鳍膜呈浅灰黑色。	尾鳍膜呈浅灰白色。

A.2 生殖突特征

诸氏鲮虾虎鱼生殖突位于泄殖孔尾端。解剖镜下观察，成熟雄鱼个体生殖突较小，表面色素沉淀多，呈三角形，末端尖；成熟雌鱼个体生殖突明显较膨大，表面色素沉积少，呈半透明状，基部较宽，末端钝圆。

地方标准信息服务平台

附录 B

(资料性)

诸氏鲮虾虎鱼生殖毒性评价原始记录表

B.1 试验溶液配制记录表

试验溶液配制记录见表B.1。

表B.1 试验溶液配制记录表

样品名称:

样品编号:

评价日期:

样品表观性状:

评价依据:

记录时间:

稀释水: ☐曝气24 h以上的自来水, pH值: ; ☐天然海水, 盐度: , pH值: 。

称量样品____g/mL；加入____mL稀释水溶解，定容至____mL；配制成____浓度为____mg/L的贮备液。

称量阴性对照品_____，_____g；加入_____mL稀释水溶解，定容至_____mL；配制成浓度为_____mg/L的阴性对照溶液。

称量阳性样品1_____, ____g; 加入_____mL稀释水溶解, 定容至_____mL; 配制成浓度为_____mg/L的贮备液。

称量阳性样品2_____, _____g; 加入_____mL稀释水溶解, 定容至_____mL; 配制成浓度为_____mg/L的贮备液。

□ 量取助溶剂_____, _____mL; 加入_____mL稀释水溶解, 定容至_____mL; 配制成浓度为_____mg/L的助溶剂贮备液。

组别	浓度 mg/L	总体积 mL	贮备液 mL	稀释水 mL
阴性对照组				
阳性对照组1				
阳性对照组2				
试验组1				
试验组2				
试验组3				

评价人（签名）：

复核人（签名）：

B.2 试验观察和环境因子测定原始记录表

试验观察和环境因子测定原始记录见表B.2。

表B.2 试验观察和环境因子原始记录表

样品名称： 样品编号： 评价日期：
 样品表观性状： 评价依据： 记录时间：
 毒性效应（a） 毒性效应（b）
 毒性效应（c） 毒性效应（d）

注：根据观察结果，可增加毒性效应编号。

☐ 预试验 ☐ I 期生殖毒性试验 ☐ II 期生殖毒性试验（在相应选项前的口内划“√”）

组别	存活数	水温 ℃	pH	盐度 ‰	DO mg/L	流速 L/s	毒性效应
阴性对照组	A						
	B						
	C						
阳性对照组 1	A						
	B						
	C						
阳性对照组 2	A						
	B						
	C						
助溶剂对照组	A						
	B						
	C						
组 1: mg/L	A						
	B						
	C						
组 2: mg/L	A						
	B						
	C						
组 3: mg/L	A						
	B						
	C						

注：“毒性效应”列填入的数字和字母分别表示改组出现死亡以外的毒性效应的鱼数及相应效应的编号。

评价人（签名）：

复核人（签名）：

B.3 VTG mRNA 相对表达量（荧光阈值 Ct）原始记录表

VTG mRNA 相对表达量（荧光阈值 Ct）原始记录见表 B.3。

表B.3 VTG mRNA 相对表达量（荧光阈值 Ct）原始记录表

样品名称： 样品编号： 评价日期：
 样品外观性状： 评价依据： 记录时间：

组别			阴性对照组	阳性对照组 1	阳性对照组 2	组 1 mg/L	组 2 mg/L	组 3 mg/L
内参 β-actin	A	①						
		②						
		③						
	B	①						
		②						
		③						
	C	①						
		②						
		③						
VTG 基 因	A	①						
		②						
		③						
	B	①						
		②						
		③						
	C	①						
		②						
		③						

评价人（签名）： 复核人（签名）：

B.4 AR mRNA 相对表达量（荧光阈值 Ct）原始记录表

AR mRNA相对表达量（荧光阈值Ct）原始记录见表B.4。

表B.5 性腺指数原始纪录表

样品名称:

样品编号:

评价日期:

样品表观性状:

评价依据:

记录时间:

[illegible]

评价人（签名）：

复核人（签名）：

B.6 生殖力原始记录表

生殖力原始记录见表B.6。

表B.6 生殖力原始记录表

样品名称：

样品编号：

评价日期：

样品外观性状：

评价依据：

记录时间：

雌鱼 编号	开始时 体长 mm	产卵量 粒							结束时 体长 mm
		第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	第6次	第7次	
组	①								
	②								
	③								
	④								
	⑤								
	⑥								
	⑦								
	⑧								
	⑨								
	⑩								
组	①								
	②								
	③								
	④								
	⑤								
	⑥								
	⑦								
	⑧								
	⑨								
	⑩								
组	①								
	②								
	③								
	④								
	⑤								
	⑥								
	⑦								
	⑧								
	⑨								
	⑩								

评价人（签名）：

复核人（签名）：

B.7 孵化率原始记录表

孵化率原始记录见表B.7。

表B.7 孵化率原始记录表

样品名称： 样品编号： 评价日期：
样品表现性状： 评价依据： 记录时间：

批次										
0 h	总卵数									
	水温									
	盐度									
	pH									
	溶解氧 mg/L									
24 h	水温									
48 h	水温									
72 h	水温									
	孵出数									
96 h	水温									
	孵出数									
120 h	水温									
	盐度									
	pH									
	溶解氧 mg/ L									
	孵出数									
孵化率										

评价人（签名）： 复核人（签名）：

B.8 不投饵存活系数原始纪录表

不投饵存活系数原始纪录见表B.8。

表B.8 不投饵存活系数原始纪录表

样品名称：样品编号：评价日期：

样品表观性状：评价依据：仔鱼出膜时间：

时间 d	水温 ℃	项目	A 组					B 组					C 组				
0		仔鱼数															
		盐度															
		溶解氧 mg/L															
		pH															
1		存活仔鱼数															
2		存活仔鱼数															
3		存活仔鱼数															
4		存活仔鱼数															
5		存活仔鱼数															
6		存活仔鱼数															
7		存活仔鱼数															
8		存活仔鱼数															
9		存活仔鱼数															
		盐度															
		溶解氧 mg/L															
		pH															

评价人（签名）：

复核人（签名）：

附录 C (规范性)

VTG mRNA 和 AR mRNA 相对表达量测定方法

C.1 肝脏样品制备

按50 mg/mL~100 mg/mL加入TRIzol至含有肝脏组织的离心管，组织体积不超过TRIzol体积的10%，用电动匀浆器匀浆1 min~2 min。

C.2 核酸提取

C.2.1 TRIzol匀浆后的肝脏组织室温放置5 min，使其充分裂解。12000 g离心5 min，弃沉淀。

C.2.2 按每毫升TRIzol加入200 μ L氯仿，振荡混匀后室温放置15 min，禁用涡旋振荡器。4 $^{\circ}$ C，12000 g离心15 min。

C.2.3 吸取上层水相，至另一离心管中，按每毫升TRIzol加入0.5 mL异丙醇，混匀，室温放置5 min~10 min。4 $^{\circ}$ C，12000 g离心10 min。

C.2.4 弃上清，RNA沉于管底，按每毫升TRIzol加入1 mL 75%乙醇，温和振荡离心管，悬浮沉淀。4 $^{\circ}$ C，8000 g离心5 min。

C.2.5 尽量弃上清，室温晾干或真空干燥5 min~10 min。

C.2.6 用50 μ L去离子水溶解RNA样品，去离子水必须用DEPC处理并高压灭菌。

C.2.7 测OD值定量RNA浓度和纯度。

C.3 反转录

按SYBR GREEN法，具体操作按照反转录试剂盒执行。

C.4 荧光定量 PCR 扩增

C.4.1 扩增引物

PCR扩增引物序列见表C.1。

表C.1 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列
卵黄蛋白原	VTG-F:AATGCCATGTTCTCAGCGA VTG-R:TCAGCTTCTCTGCACCCTTG
雄激素受体	AR-F: GTGGCGTACAACGAGTCCAG AR-R: TCATCGGAGCAGATCAGGCA
内参基因 β -actin	ACT-F:GGAAGGTGGACAGAGAAGCC ACT-R:TGCTGACAGGATGCAGAAGG

C.4.2 扩增体系的配制

设PCR反应数为n，其中n为待检样品数×重复数3+阳性管数×重复数3+阴性管数×重复数3+空白管数×重复数3，每个样本测试反应体系配制见表C.2。配制完毕的反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。

表C.2 每个样品反应体系配置表

试剂	用量	终浓度
SYBR Premix Ex Taq™ (2×)	10 μL	1×
PCR Forward Primer(10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer(10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
ROX Reference DyeI (50×)	0.4 μL	1×
DNA 模板	2 μL	小于 100 ng
dd H ₂ O (灭菌双蒸水)	6 μL	/
Total	20 μL	/

C.4.3 加样

在各设定的荧光RT-PCR管中分别加入C.3反转录获得的cDNA模板，空白管加入灭菌双蒸水，盖紧管盖后，500 g离心30 s。放入荧光PCR检测仪内。

C.4.4 RT-PCR扩增

记录样品摆放顺序，按照两步法扩增，①95 ℃，30 s；②95 ℃，5 s；60 ℃，34 s，40个循环。每个循环退火延伸（60 ℃）时收集荧光信号。

C.4.5 结果判定

C.4.5.1 阈值设定

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果，Ct值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

C.4.5.2 质控标准

空白对照无Ct值，且无典型扩增曲线；阳性对照的Ct值≤27，并出现典型的扩增曲线。否则，此次试验无效。

C.4.5.3 结果描述

采用相对 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算VTG mRNA和AR mRNA在雄鱼肝脏组织中的相对表达量。

地方标准信息服务平台

广东省地方标准
诸氏鲮虾虎鱼 毒理学评价
第4部分：生殖毒性
DB44/T 2340.4—2021

*

广东省标准化研究院组织印刷
广州市海珠区南田路563号1304室
邮政编码：510220
电话：020-84250337