

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS XXXX—XXXX

斑马鱼模型构建与表征通用要求

General requirements for zebrafish model construction and
characterization

（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

广西标准化协会 发 布

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 缩略语 2

5 基本要求 2

6 模型构建准备 2

7 模型构建要求 2

8 模型表征要求 5

9 生物安全与伦理要求 6

10 质量控制 6

11 档案管理 6

附录 A（资料性） 斑马鱼卵相关发育阶段..... 7

附录 B（资料性） Tol2 转座子技术构建转基因斑马鱼示意图 12

参考文献 13

前 言

本文件参照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专利的责任。

本文件由广西实验动物学会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西新桂环保科技集团有限公司、广西新百桂科技有限公司、广西医科大学药学院、广西壮族自治区水产科学研究院、广西壮族自治区地质环境监测站、广西民族大学、桂林理工大学化学与生物工程学院、广西壮族自治区药品检验研究院、广西壮族自治区药用植物园、广西生态修复协会、广西北投城市环境治理集团有限公司、广西壮族自治区环境保护科学研究院、广西壮族自治区分析测试研究中心、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西壮族自治区生态环境监测中心、广西壮族自治区国有东门林场、广西南宁北控水务有限公司、四川省地质工程勘察院集团有限公司、广西壮族自治区林业科学研究院、成都理工大学、昆明理工大学、广西环保产业投资集团有限公司、安徽省地勘局第一水文工程地质勘察院、云南南方地勘工程有限公司。

本文件主要起草人：甘惠云、刘振宇、叶宗达、玉一岚、毛志刚、朱远建、叶家义、梁楠、何娜、黄宁、冀广鹏、傅强、甘纯、温志玲、高小媛、席程、赖泽锋、李霞、朱佳杰、姜建萍、张赞、李丹凤、韦明利、姚久祥、王朝胜、邓建黄妙、霍娟、张慧杰、吴家勇、容贤健、潘翠、林欣、罗艳、潘艳坤、杜寒春、李翠萍、石梁稳、刘维明、张照远、马宏伦、赖海明、胡衍衡、袁伟、王川、莫雯霞、刘富奇、张洁、郑立博、敬海霞、王研、高伏芳、梁达、李嘉鑫。

斑马鱼模型构建与表征通用要求

1 范围

本文件界定了斑马鱼模型构建与表征通用要求涉及的术语和定义、缩略语，规定了斑马鱼模型构建与表征的基本要求、模型构建准备、模型构建、模型表征要求、生物安全与伦理、质量控制等要求，描述了斑马鱼模型构建过程的追溯方法。

本文件适用于斑马鱼模型构建与表征通用要求。

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 14925 实验动物 环境及设施
GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求
GB/T 39649 实验动物 实验鱼质量控制
GB/T 42011 实验动物 福利通则
HJ 1069 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法
HJ 1455 水质 急性毒性的测定 斑马鱼法
T/CALAS 153 实验动物 斑马鱼胚胎期管理指南
T/CAS 768 实验用斑马鱼鱼房建设与养殖规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

斑马鱼模型 zebrafish model

在可控实验条件下，以斑马鱼为受试生物，通过设定标准化暴露方法与可量化观察终点，开展疾病发生发展机制研究、药物毒理与药效评价、环境化学物质生态毒性风险评估等研究内容的一类体内实验系统。

3.2

表征 characterization

对构建的斑马鱼模型进行表型、基因型、生化及影像学等多维度的检测与描述，以确认模型是否成功模拟目标特征的过程。

3.3

野生型 wild type

未经过靶向基因改造或特定诱导处理的正常斑马鱼品系。

3.4

半数致死剂量（浓度） median lethal dose (concentration) ; LC50

在给定测试周期内，导致50%受试生物死亡的受试物剂量或浓度。

[来源：HJ 1257—2022，2.1.34]

3.5

半数效应浓度 median effect concentration; EC50

在给定测试周期内，导致50%受试生物出现某观察效应的受试物浓度。

[来源：HJ 1257—2022，2.1.32]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Cas9: CRISPR关联蛋白9 (CRISPR-associated protein 9)

Cas9 mRNA: CRISPR关联蛋白9信使RNA (CRISPR-associated protein 9 messenger RNA)

cDNA: 互补脱氧核糖核酸 (complementary DNA)

DMSO: 二甲基亚砜 (Dimethyl Sulfoxide)

dpf: 受精后天数 (days post fertilization)

H&E: 苏木精-伊红染色 (Hematoxylin and Eosin stain)

hpf: 受精后小时 (hours post fertilization)

MO: 反义吗啉寡核苷酸 (Morpholino)

MPTP: 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)

miRNA: 微小核糖核酸 (micro RNA)

mRNA: 信使核糖核酸 (messenger RNA)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

RT-PCR: 逆转录聚合酶链式反应 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

sgRNA: 单链向导核糖核酸 (single-guide RNA)

5 基本要求

5.1 环境设施应符合 GB/T 39649、GB 14925、T/CAS 768 的要求。

5.2 技术人员要求:

- 具备分子生物学、发育生物学或实验动物学等相关专业的背景,并经过专业技术培训;
- 每年至少进行一次健康检查。

6 模型构建准备

6.1 实验用斑马鱼应按 T/CAS 768 的规定准备,胚胎按 T/CALAS 153 的规定收集。

6.2 斑马鱼质量应符合 GB/T 39649 的要求。

6.3 斑马鱼卵相关发育阶段图符合 HJ 1069 的要求,见附录 A。

7 模型构建要求

7.1 基因敲除模型

7.1.1 靶点设计与筛选

针对目标基因设计适宜的sgRNA靶点,应评估靶点的特异性和打靶效率,根据基因敲除的难度选择适宜的靶点个数进行效率比较。

7.1.2 sgRNA 制备

采用体外转录方法合成sgRNA,检测其浓度和纯度。sgRNA与Cas9 mRNA或Cas9蛋白宜按1.5:1.3的比例混合,其中示踪酚红不应超过总体积10%。

7.1.3 显微注射

在斑马鱼一细胞期胚胎将混合体系注入卵黄或细胞核,注射剂量和体积应经过优化,胚胎存活率>70%。

注:“一细胞期胚胎”是指受精卵完成受精后、尚未进行第一次卵裂前的短暂阶段。

7.1.4 突变检测

注射后的胚胎发育至适宜阶段（48 hpf~72 hpf），提取基因组DNA，通过错配切割酶法检测、PCR扩增结合Sanger测序等方法检测靶位点的突变效率。

7.1.5 可遗传突变筛选

将F0代嵌合体与野生型斑马鱼测交获得F1代，通过测序筛选携带可遗传突变的F1个体，F1代杂合子自交获得F2代纯合突变品系。

7.1.6 建系与保种

建立稳定的突变品系，包括杂合子保种和纯合子繁育，记录详细的系谱信息。

7.1.7 模型评价

7.1.7.1 经基因型测序鉴定，靶基因位点已按预期发生缺失、移码或替换，无脱靶突变及大片段染色体异常，目标蛋白表达缺失或显著降低，符合敲除预期。

7.1.7.2 形态、行为等表型稳定出现且与野生型存在明显差异，表现为靶基因功能丧失相关的发育缺陷、体色或组织结构改变、运动及行为异常等可量化特征。

7.1.7.3 该实验鱼在后续繁殖保种过程中，敲除等位基因按孟德尔规律稳定遗传，基因型与表型完全共分离，表型在不同批次及不同养殖条件下均可重复。

7.2 基因敲入模型

7.2.1 靶点与供体设计

针对目标位点设计sgRNA和同源供体模板。宜采用靶向内含子策略维持内源基因完整性。

7.2.2 供体质粒构建

构建含目的敲入序列（如报告基因标签）的供体质粒，供体应包含适宜长度的同源臂。

7.2.3 显微注射

将Cas9 mRNA或Cas9蛋白、sgRNA和供体质粒共同注入斑马鱼一细胞期胚胎卵黄或细胞核。

7.2.4 敲入验证

通过PCR扩增结合Sanger测序验证正确敲入事件，宜采用荧光标记辅助筛选。

7.2.5 品系建立与传代

按7.1.5和7.1.6的要求建立和维持敲入品系。

7.2.6 模型评价

7.2.6.1 经基因型测序鉴定后，与导入的基因片段一致，转录蛋白表达水平符合预期。

7.2.6.2 形态、行为等表型稳定出现，且与野生型有明显差异，表现在体色、靶向组织部位荧光反应等。

7.2.6.3 该实验鱼在后续的繁殖保种过程中，通过转基因实现的表征可稳定遗传，表型可重复。

7.3 转基因模型

7.3.1 载体构建

选用To12转座子系统或其他稳定的转基因系统，构建含目的基因和筛选标记（如荧光蛋白基因）的表达载体。To12转座子技术构建转基因斑马鱼示意图见附录B。

7.3.2 共注射

将转基因质粒与To12转座酶mRNA（400 ng/μL~500 ng/μL）和To12转座子质粒（100 ng/μL~120 ng/μL）1 nL~2 nL共同注射到斑马鱼1~4细胞期卵黄。

7.3.3 阳性筛选

注射后胚胎发育至适宜阶段0 dpf~4 dpf (0 hpf~96 hpf)，通过荧光显微镜观察筛选表达荧光信号的F0胚胎。

7.3.4 建系

将F0阳性个体养殖至成鱼后与野生型测交，筛选稳定遗传的F1转基因品系。宜筛选至少3~5尾独立建系F0。

7.3.5 品系维持

通过纯合交配或杂合维持方式保种，定期检测转基因的稳定性。

7.3.6 模型评价

按7.2.6的要求进行评价。

7.4 基因敲降模型

7.4.1 MO设计与筛选

针对目标基因的翻译起始位点或剪接位点设计特异性MO，同时设计错义对照MO作为阴性对照，评估MO的脱靶效应。

7.4.2 MO制备

将冻干MO溶解于无菌去离子水或专用缓冲液中，测定浓度，分装保存于-20℃。宜通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测MO纯度。

7.4.3 显微注射

在斑马鱼一细胞期胚胎将MO溶液注入卵黄或细胞核，注射浓度与体积应通过预实验优化，胚胎存活率>70%。对于剪接型MO，宜联合注射p53 MO降低非特异性凋亡。

7.4.4 敲降效率验证

注射后胚胎发育至适宜阶段（24 hpf~72 hpf），提取总RNA反转录为cDNA，通过RT-PCR结合琼脂糖凝胶电泳检测剪接异常，或通过Western Blot检测目标蛋白表达水平，确认敲降效率>50%。

7.4.5 表型分析

对敲降胚胎进行形态学、行为学及分子水平检测，与野生型及对照MO组对比，确认目标基因功能缺失导致的特异性表型。

7.5 物理/手术损伤模型

7.5.1 实验对象准备

选用发育至适宜阶段的健康斑马鱼（2 dpf~5 dpf幼鱼或成年鱼），麻醉后固定于手术操作板，维持操作期间水体持续供氧。

7.5.2 损伤操作

7.5.2.1 尾鳍切断

选用3 dpf AB品系斑马鱼，于显微镜下操作，用无菌手术刀片在尾鳍末端1/3~1/2处垂直切断，伤口平整，不应撕裂周围组织。2 d后，观察并拍摄尾鳍，统计尾鳍面积。

7.5.2.2 脊髓横断

在卵黄囊与躯干交界处背部切开皮肤，用显微手术刀横向切断脊髓，不应损伤背大动脉。

7.5.2.3 创伤性脑损伤

使用精密显微穿刺针在特定脑区（如端脑、中脑）进行定量穿刺，控制穿刺深度（1.5 mm～2.0 mm）与力度。

7.5.3 术后护理

术后将斑马鱼在纯水中静养30 min，再转移至含抗生素（如10 mg/L恩诺沙星）的养殖水中，水温维持28.5℃，每日换水，观察存活率与伤口愈合情况。

7.5.4 模型评价

术后6 h、12 h、24 h、3 d、7 d，通过活体成像、组织切片H&E染色、免疫荧光标记等方法，观察损伤部位炎症反应、细胞增殖与再生情况，量化再生速率与功能恢复程度。

7.6 化学/环境暴露模型

7.6.1 化学诱导模型

7.6.1.1 诱导方案设计

根据糖尿病、帕金森病、肝损伤等目标疾病，对应选择高浓度葡萄糖、MPTP、对乙酰氨基酚等诱导剂，通过预实验确定最佳诱导浓度、暴露时间与给药途径。

7.6.1.2 模型建立

将斑马鱼胚胎、幼鱼或成鱼暴露于含诱导剂的养殖水中，设置溶剂对照组（如0.1% DMSO），每组样本量≥30尾。

7.6.1.3 模型评价

通过行为学检测、生化指标分析、组织病理学观察及分子标志物检测，确认模型成功率>60%。

7.6.2 环境/毒理学暴露模型

7.6.2.1 暴露方案设计

根据受试物性质设置至少5个浓度梯度（含空白对照与溶剂对照），暴露周期根据研究目的设定：急性暴露24 h～96 h、慢性暴露7 d～30 d。

7.6.2.2 暴露操作

采用半静态换水法，每日更换含受试物的养殖水，维持受试物浓度稳定；养殖条件符合6.2的规定。

7.6.2.3 毒性评价

统计半数致死剂量（浓度）、半数效应浓度，检测发育毒性、生理毒性、行为毒性及分子毒性，计算EC₅₀值或LC₅₀值和LID值，按HJ 1069、HJ 1455要求判定毒性等级。

8 模型表征要求

8.1 存活与发育指标

统计死亡率（≤10%）、孵化率（≥90%）、畸形率（≤10%），记录半数致死剂量（浓度）或不引起受试对象死亡的最高浓度。

8.2 形态、生理与行为学指标

观察体长、眼径等形态学变化；检测生理功能指标（如心率）；检测行为学改变（如运动轨迹、趋触性、光暗偏好、惊吓反应）。

8.3 组织学与病理学检查

取目标组织（如肝脏、心脏、脑组织等）进行H&E染色、特殊染色或原位杂交，观察细胞结构改变、纤维化、坏死等病理特征。

8.4 分子与生化指标

检测目标基因/miRNA的表达量、蛋白水平、氧化应激指标及凋亡相关标志物。

8.5 影像学与活体动态监测

利用转基因荧光鱼结合共聚焦/光片显微镜，进行活体动态成像（数据的格式以及有效期的界定）与定量分析。

9 生物安全与伦理要求

9.1 实验动物福利应符合 GB/T 42011 的要求。

9.2 操作应符合 GB 14925 及机构内部生物安全管理规定。

9.3 化学废液、基因修饰生物材料、动物尸体及废弃胚胎应分类收集，并 GB 14925 的要求进行无害化处理，基因修饰斑马鱼应严格管控，不应逃逸进入自然环境。

9.4 仁慈终点、安死术等应按 GB/T 35823 的要求执行。

10 质量控制

10.1 显微注射胚胎的存活率 $>70\%$ 。

10.2 空白对照存活率 $\geq 90\%$ 。

11 档案管理

应保留实验记录，数据应真实、准确、可追溯，保存期不少于5年。记录内容至少包括：

——斑马鱼信息：品系、来源、龄期；

——水质参数：pH 值、温度、硬度等信息；

——试剂信息：化学式、来源、试剂编号、浓度、用量等；

——实验信息及结果：操作时间、原始图像、原始数据、分析结果。

附 录 A
(资料性)
斑马鱼卵相关发育阶段

见图A. 1～A. 14。



图 A. 1 合子期/1-细胞期

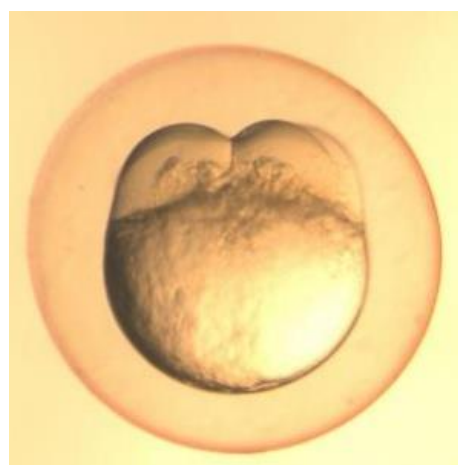


图 A. 2 卵裂期/4-细胞期



图 A. 3 卵裂期/8-细胞期



图 A. 4 囊胚期/128-细胞期

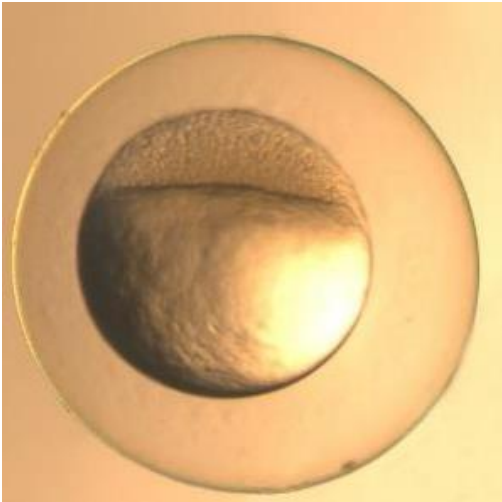


图 A. 5 囊胚期/球形



图 A. 6 囊胚期/穹顶

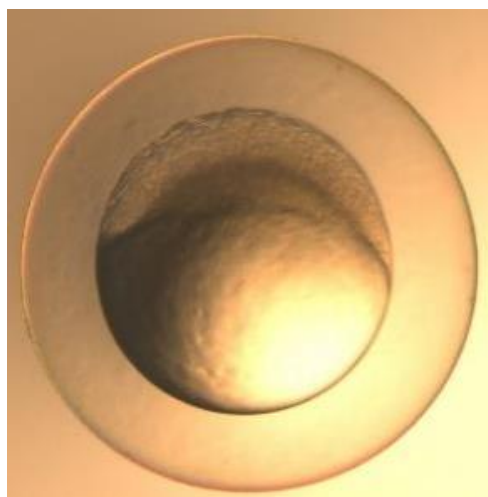


图 A. 7 原肠期/30%外包

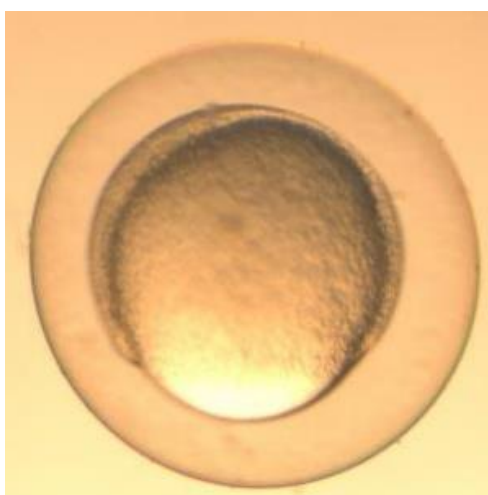


图 A. 8 原肠期/75%外包

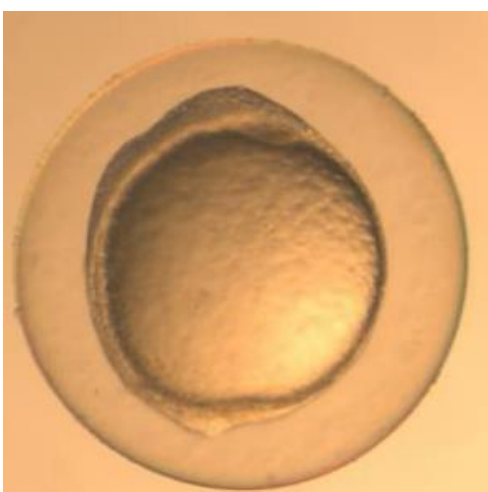


图 A. 9 原肠期/尾芽



图 A. 10 体节期/6 体节

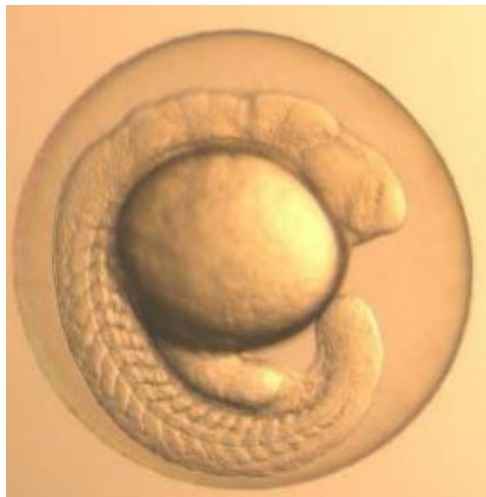


图 A. 11 体节期/18 体节



图 A. 12 原基期

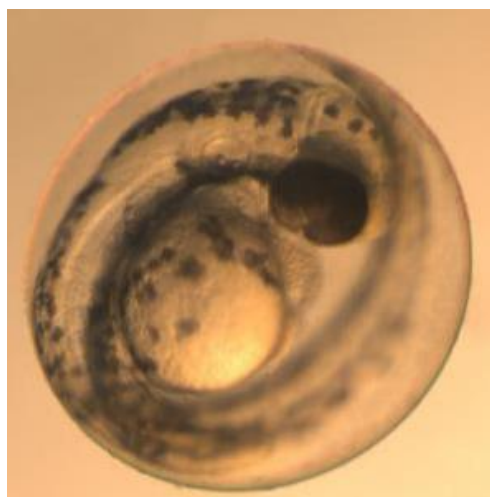


图 A. 13 孵化期

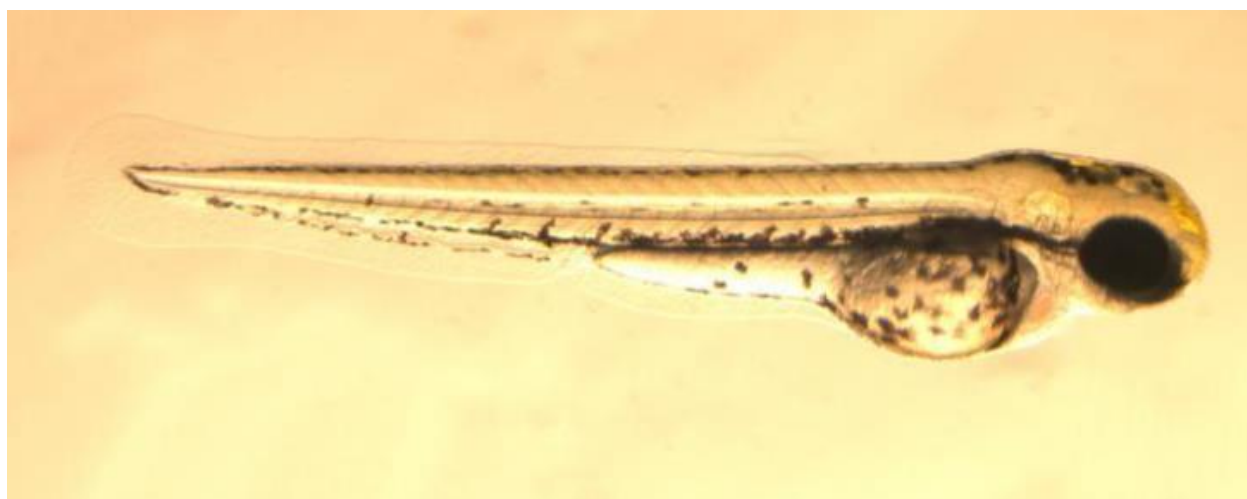
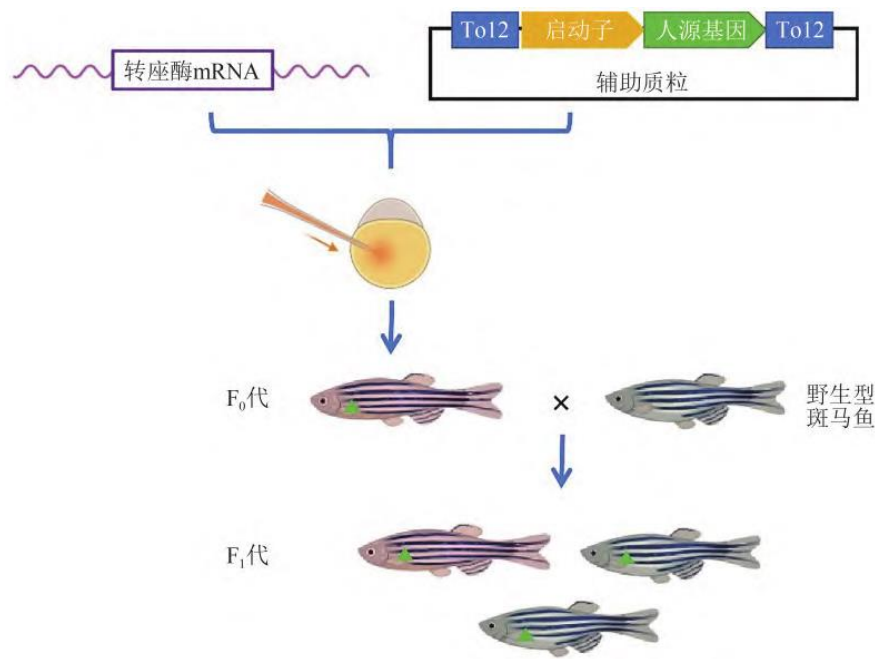


图 A. 14 幼鱼

附 录 B
(资料性)

ToI2 转座子技术构建转基因斑马鱼示意图

见图B. 1。



表B. 1 ToI2 转座子技术构建转基因斑马鱼示意图

参 考 文 献

- [1] GB/T 35892—2018 实验动物 福利伦理审查指南
 - [2] HJ 1257—2022 化学物质环境管理 化学物质测试术语
 - [3] 孙晓月,朱然然,刘可春,等.人源化斑马鱼模型的构建技术创新及其在疾病研究中的应用进展[J].生物技术进展,2026,16(3):618-625. 1. 2026. 0019.
-