



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 45221—2025

## 化学品 EASZY 试验 利用转基因 *tg* (*cyp19a1b :GFP*) 斑马鱼胚胎通过 雌激素受体检测内分泌活性物质

Chemicals—EASZY assay—Detection of endocrine active substances, acting through estrogen receptors, using transgenic *tg* (*cyp19a1b :GFP*) zebrafish embryos

2025-01-24 发布

2025-05-01 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 目 次

前言 .....	III
引言 .....	IV
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义、缩略语 .....	1
4 试验原理 .....	2
5 受试物信息 .....	3
6 能力验证化学品 .....	3
7 试验准备 .....	4
8 试验程序 .....	6
9 数据分析和结果评价 .....	7
10 质量保证与质量控制 .....	8
11 结果报告 .....	8
附录 A (资料性) <i>tg (cyp19a1b :GFP)</i> 基因构造 .....	10
附录 B (资料性) 通过诱导 GFP 表达来测定化学品产生雌激素活性的途径 .....	11
附录 C (资料性) EASZY 试验流程 .....	13
附录 D (资料性) EASZY 试验成像分析 .....	15
附录 E (资料性) 96 h 后转基因斑马鱼体内荧光成像 .....	16
附录 F (资料性) 转基因斑马鱼的体内成像: 广角荧光显微镜 .....	18
附录 G (资料性) 转基因斑马鱼的体内成像: ImageJ 中图像分析宏的使用示例 .....	19
附录 H (资料性) 数据报告和分析 .....	24
附录 I (资料性) 数据统计分析的流程图 .....	31
附录 J (资料性) EASZY 试验中的浓度-反应关系示例 .....	32
参考文献 .....	38

## 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。

本文件由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本文件起草单位：广东省科学院微生物研究所(广东省微生物分析检测中心)、生态环境部固体废物与化学品管理技术中心、广东省生物技术研究院(广东省实验动物监测中心)、中检科健(天津)检验检测有限责任公司、清华大学、完美(广东)日用品有限公司。

本文件主要起草人：梅承芳、许玫英、许玉洁、李建军、窦从从、周小红、丰时运、王鹏、高亮、刘洪英、曾国驱、刘超武、周丽丽、刘纯新、肖亿金、高彩霞、袁艺。

## 引 言

EASZY[利用转基因 $tg(cyp19a1b;GFP)$ 斑马鱼胚胎通过雌激素受体检测内分泌活性物质]试验是一种基于机制的体内筛选试验,旨在通过诱导 $cyp19a1b$ 启动子驱动的绿色荧光蛋白(GFP)的表达,检测作为雌激素受体激动剂的内分泌活性物质。EASZY试验可用于检测化学物质对转基因 $tg(cyp19a1b;GFP)$ 斑马鱼胚胎暴露96h的雌激素活性。附录A描述了用于建立转基因品系的基因结构。

$cyp19a1b$ 基因编码的脑芳香化酶,是一种负责从雄激素中合成雌激素的酶。在鱼类中, $cyp19a1b$ 基因的表达仅限于放射状胶质细胞,它是从胚胎期到成年期产生新神经元的祖代细胞。 $cyp19a1b$ 基因的转录需要被激活的雌激素受体(ERs)、结合于雌激素反应元件(EREs)的配体-ER复合物以及位于 $cyp19a1b$ 基因启动子区域的半个EREs共同参与。 $cyp19a1b$ 调控还需要与胶质细胞x反应元件(GxRE)结合的胶质细胞特异性因子与ERE序列的协同作用。GxRE在 $cyp19a1b$ 基因的细胞特异性调控及其受雌激素的调控中发挥着重要作用。

除雌激素外,类固醇雄激素也可调控 $cyp19a1b$ 基因的转录活性。对于可芳构化的雄激素(如睾酮),这种调控预示着它们可被芳构化为雌激素,随后与ERs结合并诱导 $cyp19a1b$ 的表达。而不可芳构化的雄激素中,11酮睾酮无法诱导 $cyp19a1b$ 的表达;5 $\alpha$ -二氢睾酮(DHT)则已被证实具有雌激素样活性,它通过ER依赖性途径诱导 $cyp19a1b$ 的表达。这可能是由于DHT通过3 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶的作用转化为一种已知的雌激素类固醇—— $\beta$ -二醇(见附录B)。

在斑马鱼胚胎的端脑、视前区和下丘脑中可检测到ER $\beta$ 1和ER $\beta$ 2 mRNA的表达,但对于本文件中所处发育阶段的斑马鱼胚胎,在其大脑中未检测到ER $\alpha$ 的转录体。这表明ER $\beta$ 1和/或ER $\beta$ 2可驱动芳香化酶B的表达,其中斑马鱼ER $\beta$ 2比ER $\alpha$ 对天然和合成雌激素具有更高的亲和力,这与已报道的人ERs亚型对这些物质的亲和力不同。

在转基因 $tg(cyp19a1b;GFP)$ 斑马鱼中,GFP完美地模拟了斑马鱼大脑中内源性 $cyp19a1b$ 的表达。因此,测量 $tg(cyp19a1b;GFP)$ 胚胎中的报告基因GFP,可用于评估化学品诱导 $cyp19a1b$ 基因表达的能力。

EASZY试验技术已成功应用于测试一批化合物,包括天然和合成激素、药物、农药、工业化学品,用于评估它们在 $tg(cyp19a1b;GFP)$ 斑马鱼胚胎中诱导GFP的能力。

经济合作与发展组织(OECD)修订后的指南文件No.150已将EASZY试验确定为OECD内分泌评估概念框架中的3级鱼类筛选试验,即一种提供关于特定内分泌干扰机制/通路数据的体内试验。作为3级筛选试验,EASZY试验可通过是否诱导由ER调控的 $cyp19a1b$ 启动子驱动的GFP,来识别ER信号通路上的活性和非活性受试物质。试验数据不宜用于化学品的风险评估。

# 化学品 EASZY 试验 利用转基因 $tg$ ( $cyp19a1b:GFP$ )斑马鱼胚胎通过 雌激素受体检测内分泌活性物质

## 1 范围

本文件描述了利用转基因  $tg(cyp19a1b:GFP)$  斑马鱼胚胎通过雌激素受体检测内分泌活性物质的 EASZY 试验方法,包括试验原理、受试物信息、能力验证化学品、试验准备、试验程序、数据分析和结果评价、质量保证与质量控制、结果报告。

本文件适用于筛选和评估化学品中的内分泌活性物质。

## 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 13266 水质 物质对蚤类(大型蚤)急性毒性测定方法

## 3 术语和定义、缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**激动剂 agonist**

能结合并激活特异性核受体,诱导核受体调控基因转录活性的化学物质或配体。

#### 3.1.2

**拮抗剂 antagonist**

能结合核受体,阻断或者抑制激动剂配体介导的反应的化学物质或配体。

#### 3.1.3

**活性受试物 active test chemical**

能显著诱导 GFP 表达且对 GFP 的最低平均诱导水平大于空白对照组两倍的受试化合物。

#### 3.1.4

**脑芳香化酶 brain aromatase**

由  $cyp19a1b$  基因编码,负责雌激素的内源性合成的酶。

#### 3.1.5

**效应浓度 effect concentration;  $EC_x$**

在给定测试周期内,与对照组相比,导致胚胎荧光强度降低  $x\%$  的受试物浓度。

#### 3.1.6

**雌激素活性 estrogenic activity**

受试物模拟  $17\beta$ -雌二醇作用的能力,以雌激素受体特异性的方式激活内源性  $cyp19a1b$  和/或由