

ICS 67.050
CCS C 53

团体标准

T/AHFS 002-2026

食源性污染物对卵巢健康 影响 黑腹果蝇模型快速 筛查法

Impact of Foodborne Contaminants on Ovarian
Health: A Rapid Screening Method Using the
Drosophila melanogaster Model

2026-01-05 发布

2026-01-16 实施

安徽省食品科学技术学会



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。

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这些专利的责任。

本文件由安徽医科大学提出。

本文件由安徽省食品科学技术学会归口管理。

本文件起草单位：安徽医科大学、安徽医科大学第二附属医院。

本文件主要起草人：韦田、王华、刘宗忠、蔡杨、宋玉荣、~~吴磊~~、~~朱家庄~~、~~杨俊林~~、~~赵玲俐~~、~~徐德祥~~。

本文件为首次制定。



食源性污染物对卵巢健康影响 黑腹果蝇模型快速筛查法

1 范围

本文件规定了采用黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 作为生物模型快速评估食源性污染物对卵巢健康影响的原理、试剂与溶液、仪器与设备、试验方法、数据处理与结果判定、质量控制、试验报告及生物安全与伦理。

本技术规范适用于食源性污染物卵巢毒性快速初筛，不作为判定其安全性的唯一依据。

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 35823 实验动物 动物实验通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

卵巢毒性 ovotoxicity

由外源化学物引起的卵巢结构和功能损害，可表现为卵巢萎缩或畸形、生殖干细胞数量显著减少、产卵数下降、卵子孵化率降低等。

3.2

生殖干细胞 germline stem cell

位于雌性果蝇卵巢管顶端原卵区 (germarium) 微环境内的一类成体干细胞。它通过不对称分裂进行自我更新，并产生分化的子代细胞，从而持续维持卵子发生过程，通常每个原卵区有 2~3 个生殖干细胞。

4 原理

黑腹果蝇作为经典的模式生物，其卵巢发育、卵子发生及生殖调控的核心信号通路（如 Notch、Hippo、JAK/STAT 等）与哺乳动物高度保守。食源性污染物通过饮食途径暴露于果蝇，进而影响其卵巢健康。通过检测污染物暴露后果蝇的卵巢形态结构、产卵数、卵子孵化率、生殖干细胞数等终点指标，可以快速、有效地评估该污染物对卵巢健康的潜在毒性作用。

5 试剂与溶液

5.1 标准培养基

实验所用标准培养基的配方为：玉米粉 25 g，大豆粉 2.5 g，白糖 3.625 g，红糖 10 g，酵母粉 6.25 g，琼脂 2.5 g，蒸馏水加至 500 mL。配制时，将上述成分加热煮沸溶解，室温冷却至 70 ± 2 °C 后，加入 10 mL 防腐剂溶液（配方：对羟基苯甲酸甲酯 40 g、无水乙醇 400 mL、丙酸 100 mL），搅拌均匀后分装。

5.2 受试物

根据受试物性质，选用超纯水、二甲亚砜（DMSO，CAS#67-68-5，终浓度 < 0.1 %）、乙醇（CAS#64-17-5）等溶剂配制，应记录所用溶剂及浓度。

5.3 对照物

试验应设置阴性对照组和阳性对照组。阳性对照可选择氯丙醇（如 3-氯-1,2-丙醇，CAS#96-24-2）；重金属镉（如氯化镉，CAS#10108-64-2）。阳性对照物质浓度应能稳定产生卵巢毒性效应。

5.4 解剖与固定液

磷酸缓冲盐溶液（1 × PBS，CAS#12111-21-6，pH 7.4）、0.3% PBST（1×PBS 溶液中加入 0.3% Triton-100，v/v）（Triton-100，CAS#9036-19-5）、4% 多聚甲醛磷酸缓冲液（PFA，CAS#30525-89-4）、5% 山羊血清（0.3% PBST 中加入 5% 的山羊血清原液）、免疫组化一抗稀释液、50% 甘油、指甲油。

5.5 染料与抗体

用于细胞核标记荧光染料 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 4,6-二脒基-2-苯基吲哚)；一抗 Hts (Hu-li tai shao，生殖干细胞标记物)；二抗-羊抗小鼠（FITC 或 CY3）。

6 主要仪器与设备

恒温恒湿培养箱、体视显微镜、果蝇饲养管、精密分析天平、超纯水系统、4 °C 冰箱、-20 °C 冰箱、-80 °C 超低温冰箱、倒置荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜。

7 试验方法

7.1 实验动物

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)，宜使用野生型品系。所用品系应来源清晰，遗传背景明确，并在标准条件下维持足够代数以保持遗传稳定性。

7.2 果蝇饲养环境

果蝇饲养条件：温度 25 ± 1 °C、相对湿度 60 ± 5 %、光周期 12 h 光照/12 h 黑暗循环。收集 8 h 内新羽化的成虫，用 CO₂ 短暂麻醉后进行雌雄分离。将雌性果蝇随机分入各组，确保每组初始体重和数量一致（推荐每组 ≥ 30 只，每组至少设置 3 个平行重复）。分组过程应快速完成，以减少应激。

7.3 实验设计

7.3.1 实验动物分组

将三日龄雌性果蝇随机分为以下组别，每组至少设置 3 个平行重复，每个平行不少于 30 只果蝇：

- a) 空白对照组：饲喂不含任何添加剂的标准培养基（配方见 5.1）。
- b) 溶剂对照组：若受试物需使用溶剂（如 DMSO）助溶，此组饲喂含有与受试物组最高溶剂浓度相同（例如< 0.1% DMSO）的标准培养基，以排除溶剂本身可能产生的影响。
- c) 受试物组：饲喂含有不同浓度受试物的标准培养基。通常设置低、中、高 3 个浓度梯度。建议以食品中的真实环境暴露浓度作为中剂量，并以此为基础上下调整（如缩小和放大 10 倍）设置低剂量和高剂量。具体浓度需通过预实验进行验证与优化，以确保能有效观察到剂量-反应关系。
- d) 阳性对照组：饲喂混有已知卵巢毒性食源性污染物的标准培养基。

7.3.2 饲养管理

将分组后的果蝇在标准环境下饲养，每 2 d 更换一次新鲜配制的相应培养基，以防止培养基变质及成分变化，并记录果蝇的存活情况。饲养周期为 7 d~14 d（依据预实验确定具体终点时间），饲养结束后用于本文件 7.4 的各项指标检测。

7.4 观察指标

7.4.1 产卵能力测定

将受试物暴露结束后的雌性果蝇与正常雄性果蝇按 1:1 比例配对交配。交配 24 h 后，分离雌蝇，将每只雌蝇单独转移至含有标准食物培养基的培养瓶中。此后每 24 h 更换一次新鲜培养基，并在体视显微镜下对培养基表面的卵进行计数，连续记录 7 d。最终计算每只雌蝇的日均产卵数（日均产卵数 = 7 d 内总产卵数 / 7 d / 雌蝇数量）。

7.4.2 卵子孵化率统计

完成产卵计数后，将含有受精卵的培养皿在标准环境条件下继续培养 24 h ~48 h。随后，在体视显微镜下观察并统计成功孵化的一龄幼虫（L1 幼虫）数量。卵子孵化率按以下公式计算：卵子孵化率（%）= （成功孵化的 L1 幼虫数量/观察的受精卵总数）× 100%。

7.4.3 卵巢形态观察与统计

受试物暴露结束后的雌蝇，在体视显微镜下，用解剖镊取出完整的卵巢组织，置于预冷的 1×PBS 中。观察卵巢的整体形态，重点关注卵巢管是否出现松散、断裂或其他异常结构变化。使用图像采集系统获取卵巢图像，并利用统计分析软件测量卵巢面积。

7.4.4 生殖干细胞数目统计

采用免疫荧光染色法标记并统计卵巢生殖干细胞数目，具体步骤如下：

- a) 受试物暴露结束后的雌蝇，解剖取出完整卵巢，迅速置于 4% 多聚甲醛溶液中，室温固定 10 min；
- b) 随后用 0.3% PBST 快速冲洗 2 次，再加入 0.3% PBST 置于摇床上清洗 6 次，每次 10 min；
- c) 吸弃液体，加入 5% 山羊血清，室温封闭卵巢组织至少 2 h。吸弃 5% 山羊血清，加入用免疫组化一抗稀释液稀释的 Hts 抗体（稀释比例 1:20），4 °C 冰箱中过夜孵育；
- d) 回收一抗，重复步骤 b) 后加入用 5% 山羊血清稀释的羊抗小鼠 FITC/CY3 标记的荧光二抗（稀释比例 1:500），4 °C 冰箱中过夜孵育或室温避光孵育至少 2 h；
- e) 回收二抗，重复步骤 b) 后加入细胞核 DAPI 染液，室温避光染色 8 min；
- f) 回收 DAPI 染液，重复步骤 b)；
- g) 将组织放到加有 50% 甘油的载玻片上，用解剖针将卵巢管挑开，使每个卵巢管的卵原区保持完好，然后盖玻片压片、指甲油封片，封片过程避光，4 °C 冰箱保存。
- h) 在激光共聚焦显微镜下观察卵巢卵原区生殖干细胞（图谱见附录 A），并统计其数目。

8 数据处理与结果判定

8.1 数据处理

正态分布数据以均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。多组间均数比较采用方差分析，并采用 Dunnett's t 检验进行两两比较事后检验。当 $P < 0.05$ 时，认为差异具有统计学意义。

8.2 结果判定

若受试物各剂量组与对照组相比，出现任一指标具有显著差异，且呈剂量-反应关系，则可判定为阳性，该受试物对卵巢健康具有潜在不良影响。

若受试物各剂量组与对照组相比，所有观测指标均未出现统计学显著差异，则可判定结果为阴性。

阳性对照组应出现预期的典型卵巢毒性表征，否则本次实验无效。

8.3 结果表述

结果的表述应客观、准确，并与数据分析和判定结论一致。

阴性结果表述：“在本实验条件下，未观察到[受试物名称]在本次实验所设浓度范围内对黑腹果蝇卵巢健康产生不良影响。”

阳性结果表述：“在本实验条件下，[受试物名称]可导致黑腹果蝇[具体说明影响的指标，例如：产卵数显著降低、卵子孵化率下降、卵巢形态异常（如卵巢萎缩）以及生殖干细

胞数目减少等]，且效应呈现剂量依赖性，提示其初筛结果为‘阳性’，表明该受试物可能对卵巢健康存在潜在风险。”

注：对于阳性结果，建议在讨论中明确其初步筛选性质，并指出需进一步哺乳动物模型（如小鼠、大鼠）中进行验证。

9 质量控制

实验的有效性应满足以下条件：

- a) 溶剂对照组：各项指标与空白对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。
- b) 空白对照组：果蝇存活率 $> 90\%$ ，日均产卵数处于实验室历史记录的正常范围内。
- c) 阳性对照组：与溶剂对照组相比，各项指标上出现预期的显著阳性效应 ($P < 0.05$)。

10 试验报告

试验报告包括以下内容：

- a) 试验名称、报告编号、试验单位、试验日期、试验负责人。
- b) 试验摘要。
- c) 受试物名称、CAS 号（如已知）、纯度（或含量）、生产日期（批号）、有效期、溶剂、储存条件、供应商信息。
- d) 果蝇品系、果蝇日龄、饲养温度/湿度/光周期、性别、来源。
- e) 试验条件和方法、剂量分组、剂量选择依据、染毒途径和方式、受试物配制过程、处理的雌性数、统计方法和判定标准。
- f) 试验结果：以列表方式报告空白对照组、溶剂对照组（溶剂是水则不用设置）、低剂量组、中剂量组、高剂量组的产卵数、卵子孵化率、卵巢形态、卵巢面积和生殖干细胞数目。试验结果可参考附录 B 样表进行列表报告。
- g) 试验结论：根据试验结果，对受试物是否对卵巢健康造成影响做出评估。

11 生物安全与伦理

试验废弃的果蝇、培养基及接触过污染物的器皿应作为生物有害废物，经高压蒸汽灭菌后再进行处理。操作人员应做好个人防护。

试验操作应符合 GB/T 35823 的相关规定。果蝇尸体、培养基及所有接触过污染物的废弃物均应按生物有害废弃物处理。本方法使用无脊椎动物，极大地减少了动物伦理争议，符合“3R”原则。

附录 A

(规范性)

生殖干细胞微环境观察标准图谱

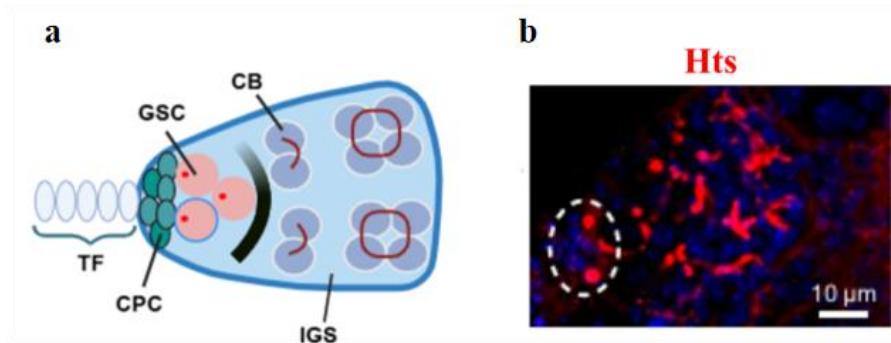


图 1 生殖干细胞微环境观察标准图谱

图 1 a: 果蝇卵巢微环境区域的示意图。TF 端丝细胞; CPC 帽细胞; IGS 内原卵区鞘细胞; GSC 生殖干细胞; CB 囊泡细胞。图 1 b: 果蝇卵巢微环境 Hts 染色示意图, 白色区域为原卵区, 其中红色球形 spectrosome 标记为生殖干细胞。

附录 B

(资料性)

试验结果样表**表 1 试验结果样表**

指标	生殖能力指标		组织形态学指标			评价
组别	平均产卵量/雌蝇 /24 h (个)	孵化率 (%)	卵巢整体形 态描述	卵巢面积 (μm^2)	生殖干细胞数 目/生殖腺(个)	与对照组是否存 在显著性差异
空白对照组						
溶剂对照组						
低剂量组						
中剂量组						
高剂量组						

参考文献

- [1] GB 15193.11 食品安全国家标准果蝇伴性隐性致死实验
- [2] Renjun Tu, Bo Duan, Xiaoqing Song, Ting Xie. (2020) Dlp-mediated Hh and Wnt signaling interdependence is critical in the niche for germline stem cell progeny differentiation. *Science Advances* 6, eaaz0480.

