

国家斑马鱼资源中心  
第五期全国斑马鱼技术培训  
(斑马鱼精子冻存技术专题)  
会议手册

2017 年 3 月

编辑人：潘鲁媛

编写人：（以姓氏排序）柳力月、谢训卫、胥贤

审定人：孙永华

版权声明：此手册为国家斑马鱼资源中心（简称 CZRC）编写，服务于 CZRC 主办的各类斑马鱼技术培训会议和技术咨询服务。本手册引用图片均已标明出处，未标明出处的图片为 CZRC 原创。此手册的版权和最终解释权归 CZRC 所有。

#### 致谢

CZRC 是由国家科技部和中国科学院共同支持建设的非营利性科研服务性机构，由中国科学院水生生物研究所代为管理。CZRC 是中国科学院模式和特色动物实验平台的核心成员，其主要支持课题有国家重大科学研究计划课题（2012CB944504）、中国科学院重点部署项目（KSZD-EW-Z-001）和湖北省科技支撑计划项目等。

# 目录

第一章 鱼类精子超低温保存原理.....	1
第一节 鱼类精子超低温保藏技术概况.....	1
第二节 冷冻保藏剂介绍.....	2
第三节 冷冻过程及复苏.....	5
第二章 斑马鱼精子冻存和体外复苏方法.....	9
第一节 斑马鱼精子冻存和复苏操作要点.....	9
第二节 斑马鱼精子冻存操作的实验细节.....	10
第三节 斑马鱼冻存精子样品的体外受精.....	13
工作附表 1 精子冻存记录表.....	15
工作附表 2 体外受精记录表.....	16
第三章 斑马鱼的养殖.....	17
第一节 斑马鱼的养殖环境.....	17
第二节 循环养殖设备介绍.....	19
第三节 斑马鱼的繁殖.....	23
第四节 幼鱼的养殖.....	24
第五节 成鱼的养殖及安乐死.....	27
第六节 斑马鱼活饵的培养.....	28
第四章 斑马鱼常见鱼病及健康维护.....	33
第一节 细菌性疾病.....	33
第二节 寄生虫疾病.....	36
第三节 非感染性和先天性疾病.....	37
第四节 斑马鱼日常健康维护.....	39



# 第一章 鱼类精子超低温保存原理

## 第一节 鱼类精子超低温保藏技术概况

### 一、鱼类精子冷冻保存的历史

鱼类精子冷冻保藏技术始于 20 世纪 50 年代初期。1953 年英国学者 Blaxter 使用干冰保存 6 月龄的大西洋鲱精巢，将精液解冻后进行授精，获得 80% 的受精率，这是首例成功的鱼类精液冻存实验。之后鱼类精液冷冻保存研究在多种鱼类上开展，早期研究主要集中在海水鱼类，后来逐渐扩展到鲤科、鲟科鱼类中。国内最早的鱼类精子冻存研究，是 1984 年王祖昆等用液氮冻存保藏草、鲢、鳙、鲮等鲤科鱼类，取得较理想的复苏受精率[1]。

斑马鱼精液的冷冻保存研究始于 1982 年，Harvey 等以甲醇作为抗冻剂，冷冻保存斑马鱼精液，获得平均 51% 的受精率[2]。现在应用较广的方法是 Moens 实验室在 Harvey 技术的基础上改进而成的 Moens-Draper protocol。该方法的优点是所需的试剂和器材简单，易于操作且适于大批量冻存[3, 4]。本次培训所使用的就是基于此操作规范的冻存方法。

### 二、低温保存技术的作用

- 1、可以将优质品系或濒临灭绝的品系长期保存起来，避免因长期养殖、近亲交配而造成的种质退化和遗传变异等现象。
- 2、节省养殖空间，以及与之相应的人力物力资源。
- 3、通过配子的冷冻保存，可以为鱼类遗传育种和生物技术研究不间断地提供材料，大大方便了遗传发育研究。

### 三、冷冻低温保存的原理

超低温保存（cryopreservation），指将生物、生命组织、或细胞等有机物质（生物材料的含水量一般在 60-90%）和其他物质在摄氏-196 度或以下的低温保存的一种技术。在 -196°C 时，细胞的生命活动几乎完全停止，但复苏后细胞的结构和功能完好。如果冷冻

过程得当，一般生物样品在 $-196^{\circ}\text{C}$ 下可保存十年以上。

应用 $-70^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 保存细胞，短期内对细胞的活性无明显影响，但随着冻存时间延长，细胞存活率明显降低。在冰点到 $-40^{\circ}\text{C}$ 范围内保存细胞的效果不佳。

#### 四、冷冻低温保存方法分类

按照冷冻保护液在冻结后是否形成冰晶来划分，冻存方法可分为非玻璃化和玻璃化冻存两种。

非玻璃化冻存是利用各种温级的冰箱分阶段降温至 $-70^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ ，然后直接投入液氮进行保存；或者是利用程控降温仪以及利用液氮的气、液相，按一定的降温速率下降至 $-100^{\circ}\text{C}$ 以下，再直接投入液氮的方法，以该方法冻结的细胞悬液或多或少都有冰晶的形成。此为细胞冻存最常用的方法。

玻璃化冻存则是指利用多种高浓度的冷冻保护剂联合形成的玻璃化冷冻保护液保护悬浮细胞，直接投入液氮进行冻存的方法，以该方法冻结的细胞悬液没有冰晶的形成。广泛应用于胚胎冷冻方面，但很少应用于普通细胞的冻存。冻存液配制较复杂，冷冻前和复苏后操作较为繁琐。

### 第二节 冷冻保藏剂介绍

#### 一、低温损伤

样品从预处理到冻存到液氮的整个过程都会面临不同程度的细胞损伤，主要包括冷冻保护剂毒性损伤，溶质损伤，冰晶损伤等（图 1.1）。

在鱼类精子冻存中使用较广的冷冻保护剂是一些渗透性较强的小分子物质，在降温过程中通过结合水分子和渗透调节有效地减少溶质损伤和冰晶损伤，但这些小分子物质多具有一定的细胞毒性，如甲醇在高浓度下可以损伤 DNA。精子的结构比较特殊，粘稠度较高的甘油容易导致精子尾巴的交联，严重影响复苏效率。

样品在保存到液氮前还需要先慢速降温到合适的温度，降温的过程是传热与渗透两个因素相互作用的过程，需要通过实验反复摸索确定最佳降温速率。降温速度过慢容易导致细胞严重脱水失活，细胞外溶液结冰和溶质损伤，而降温速度过快则容易造成胞内

冰晶损伤。低温损伤不可避免，在冷冻实验过程中尽量选择渗透性强毒性低的冷冻保护剂，使用合适的降温速率，以减少不必要的细胞损伤，提高复苏存活率。

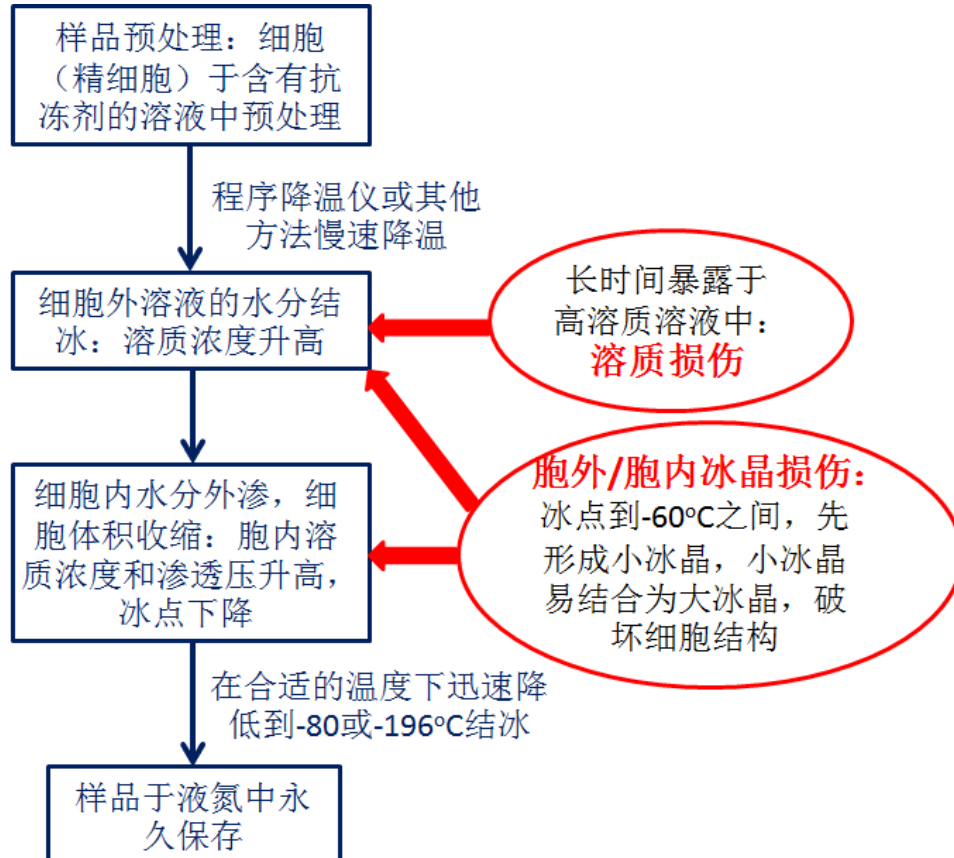


图 1.1 慢速冷却低温保存技术原理图

## 二、稀释缓冲液（Extender）配制原则和各离子成分的作用

冻存鱼类精子时，常常使用稀释缓冲液作为保存媒介。稀释缓冲液的成分主要由两部分组成：基础缓冲溶液和冻存保护剂。

### 1、稀释缓冲液（Extender）配制原则

稀释缓冲液是为了给鱼类精子提供一个适宜的渗透压和 pH 环境，来延长其体外存活时间，维持良好生理状态以更好地抵抗低温损伤。

配制的主要原则如下：

溶液等渗性：与鱼类精子等渗或接近，以保持其正常结构；

各成分互不反应，提供所需的营养和生活条件；

具有一定的缓冲能力和适宜的 pH 值；

对鱼类精子无毒害作用，最好含有抗菌物质。

## 2、稀释缓冲液（Extender）各离子的作用：

$K^+$  可以抑制多数鱼类（鲤科除外）精子的活动；

$Na^+$  可以降低  $K^+$  的抑制作用；

$Ca^{2+}$ ， $H^+$ ， $Mg^{2+}$  可以部分解除  $K^+$  的抑制作用；

$Ca^{2+}$  可以调节鱼类精子活力，是精子激活所必需的。

## 三、冷冻保护剂的分类

冷冻保护剂可分为渗透性和非渗透性两类。

1、渗透性冷冻保护剂可以渗透到细胞内，一般是一些小分子物质，主要包括甘油（Glycerol）、二甲亚砜（DMSO）、乙二醇（EG）、丙二醇（PG）、二甲基乙酰胺（DMA）、二甲基甲酰胺（DMF）、甲醇（MeOH）等。这些冷冻保护剂可保护细胞免受或少受溶质损伤和冰晶损伤。

其作用主要体现以下 3 个方面：

渗透性冷冻保护剂容易同溶液中的水分子结合，从而降低冰点，减少冰晶的形成。 $-3^{\circ}C$  -  $-60^{\circ}C$  是水发生强烈结晶过程的温度区域， $-60^{\circ}C$  以下，自由水已结冰，结合水的移动受限，对细胞的危害程度减少。冷冻保护剂可以降低危险温区的上限温度，当冷冻保护剂浓度足够高，危险温区上限和下限非常接近，危险温区就几乎不存在了。

在细胞冷冻悬液完全凝固之前，渗透到细胞内，在细胞内外产生一定的摩尔浓度，降低细胞内外未结冰溶液中电解质的浓度，从而保护细胞免受高浓度电解质的损伤，同时，细胞内水分也不会过分外渗，避免了细胞过分脱水皱缩。细胞得以在超低温条件下保存。

在冻存样品复苏时，一般以很快的速度升温，1-2 分钟或更短时间内即恢复到常温，细胞内外不会重新形成较大的冰晶，也不会暴露在高浓度的电解质溶液中过长的时间，从而无冰晶损伤和溶质损伤产生，冻存的细胞经复苏后仍保持其正常的结构和功能。

相对于海水鱼类胚胎，渗透性抗冻剂的毒性大小排序为：

$PG < MeOH < DMA < DMSO < EG < Gly$ 。

Yang et al 曾对 MeOH，DMSO，Gly 和 DMA 这 4 种冷冻保护剂对斑马鱼精子细胞的



毒性作过比较,同等浓度下 Gly 对精子细胞的活力影响最大[5]。

**2、非渗透性冷冻保护剂**不能渗透到细胞内，一般是些大分子物质，主要包括聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、蔗糖、果糖、聚乙二醇（PEG）、葡聚糖、白蛋白以及羟乙基淀粉等。

聚乙烯吡咯烷酮等大分子物质可以优先同溶液中水分子结合，降低溶液中自由水的含量，在冷冻前使细胞部分脱水，降低冰点，减少胞内冰晶的形成。

同时，由于其分子量大，使溶液中电解质浓度降低，减少溶质渗入细胞的量，从而减轻溶质损伤。

相对于渗透性冷冻保护剂毒性较小，混合添加可以进一步减少细胞毒性。

研究表明果糖对冷冻精子的生存指数和存活时间方面优于蔗糖，葡萄糖最差。

冷冻保护剂对细胞的冷冻保护效果还与冷冻速率、冷冻温度和复温速率有关。而且不同的冷冻保护剂其冷冻保护效果也不一样。

同时我们应继续筛选低毒高效的冷冻保存剂，尽量减少冷冻保存剂的毒性，避免冷冻保存剂对鱼类精子遗传结构的影响。

### 第三节 冷冻过程及复苏

#### 一、冷冻速率与细胞损伤

##### 1、冷冻速率

冷冻速率是指降温的速度，直接关系到冷冻效果。

细胞在冷冻过程中会发生如下变化：

当细胞被冷至-5°C 时，因溶液中加入有冷冻保护剂而降低溶液的冰点，细胞内外溶液仍未结冰；

当被冷至-5°C- -15°C 之间时，细胞外溶液先出现结冰而细胞内仍保持未结冰状态。细胞内未结冰的水分子会比细胞外部分结冰溶液中的水分子具有更高的化学能。其结果是，细胞内水分子为了和细胞外水分子保持化学能的平衡，会向细胞外流动，细胞开始脱水。

温度继续降低，细胞外的水分子全部结冰。-15°C- -60°C 期间，细胞内的水分逐渐凝结。因为细胞含水量、脱水程度、胞质成分、冷冻保存剂的种类等不同情况，水冻结过

程形成冰晶的情况各不相同。

## 2、冷冻速率与细胞变化

冷冻速度不同，细胞内水分向外流动的情况也不相同：

➤ 如果冷冻速度慢，细胞内水分外渗多，细胞脱水，体积缩小，细胞内溶质浓度增高，细胞内不会发生结冰；

➤ 如果冷冻速度快，细胞内水分没有足够的时间外渗，结果随着温度的下降而发生细胞内结冰；

➤ 如果冷冻速度非常快（即超快速冷冻），则细胞内形成的冰晶非常小或不结冰而呈玻璃状态（玻璃化冷冻）。Luyet（1973）证实液体的凝固可分为两种形式：一种是晶体化，溶液中的分子呈有序排列；另一种情况是非晶体即玻璃化，液体中的分子呈无序状态，保持未凝固前的状态。

一般当冷冻保护剂浓度达到 40-60%时，在快速冷冻的过程中易形成玻璃态。

## 3、冷冻速率与细胞损伤

不同的冷冻速度既然能使细胞内发生不同的生理变化，也可以对细胞产生不同的损伤。

当冷冻速度过慢时，细胞脱水严重，细胞体积严重收缩，超过一定程度时即失去活性。同时冷冻速度过慢，还会引起细胞外溶液部分结冰，从而使细胞外未结冰的溶液中溶质浓度增高，产生溶质损伤。

当冷冻速度过快时，细胞内水分来不及外渗，会形成较大冰晶，造成细胞膜及细胞器的破坏，产生细胞内冰晶损伤。

超快速玻璃化冷冻对细胞存活来说是最为理想的冷冻方法。细胞内外呈玻璃化凝固，无冰晶形成或形成很小的冰晶，对细胞膜和细胞器不致造成损伤，细胞也不会高浓度的溶质中长时间暴露而受损。

不同细胞的最适冷冻速率不同。细胞与细胞之间的最适冷冻速率可在  $1.6^{\circ}\text{C}\sim 300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，故对一种细胞进行冷冻保存之前，首先需要测定其最适冷冻速率，以保证获得最高的冷冻存活率。

精子细胞和培养细胞均是体积很小，抗冻保护剂可以较快进入细胞内，一般可以采用较快的降温速率。

## 二、复苏速率

冷冻保护体外培养物，除了必须有最佳的冷冻速率、合适的冷冻保护剂和冻存温度外，在复苏时也必须要有最佳的复温速率，这样才能保证最后获得最佳冷冻保存效果。

复温速率是指在细胞复苏时温度升高的速度。复温速率不当也会降低冻存细胞存活率。一般来说，复温速度越快越好。

常规的做法是，在 37°C（不超过 42 °C）水浴中，于 1-2 分钟内完成复苏。复温速度过慢，细胞内往往重新形成较大冰晶而造成细胞损伤。复温时造成的细胞损伤非常快，往往在极短的时间内发生。

## 三、精子冻存过程中的形态生理学变化

电镜或流式细胞仪对精子冻存前后的超微结构分析：超低温引起精子形态结构的变化主要表现在头部、中段和尾部质膜以及线粒体的剧烈膨胀甚至破裂。

紫外分光光度法对冷冻前后的虹鳉精子分析：解冻后的精子 ATP 水平明显下降，冷冻过程有大量的 ATP 损耗。另外其他相关的酶和生化物质的含量和活性也发生了改变，可能缘于冻存过程中的精子膜破损。

抗冻剂的使用导致冻存精子的激活—抑制规律发生了改变：原来抑制鲜精的高渗溶液成了冻存精子的激活液。

## 参考文献:

1. 何荫, 王.邱.陈.欧.梁., 草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲮鱼冷冻精液授精试验. 水产学报, 1984. **3**(255-257).
2. Harvey, B., *Cryopreservation of zebrafish spermatozoa using methanol*. can J zool, 1982.
3. Carmichael, C., M. Westerfield, and Z.M. Varga, *Cryopreservation and in vitro fertilization at the zebrafish international resource center*. Methods Mol Biol, 2009. **546**: p. 45-65.
4. Draper, B.W. and C.B. Moens, *A high-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization*. J Vis Exp, 2009(29).
5. Yang, H., et al., *Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish Danio rerio*. Theriogenology, 2007. **68**(2): p. 128-36.



地址：武汉市武昌区东湖南路 7 号  
邮箱：[zebrafish@ihb.ac.cn](mailto:zebrafish@ihb.ac.cn)

电话：027-68780570  
网址：<http://www.zfish.cn>

---

## 第二章 斑马鱼精子冻存和体外复苏方法

### 第一节 斑马鱼精子冻存和复苏操作要点

斑马鱼的性成熟周期是三个月。3 月龄的斑马鱼雄鱼和雌鱼已可以开始用于自然交配产卵。但是，由于此时鱼的体量依然较小，雄鱼产生精液体积过少，仍不适于收集精子样品；雌鱼产卵量也较少。都宜继续养殖至较强壮体量后再进行冻存操作。6-12 个月龄的斑马鱼雄鱼是冻存精子的最佳时期。18 个月龄之后，斑马鱼逐渐进入老年期，精液产量和质量都会下降，也不适于收集样品。雌鱼同理。

斑马鱼的养殖条件对精液样品的质量和产量都有很大影响。用于精液收集的雄鱼应当与雌鱼有自然交配经历，且交配成功产卵。冻存前一月，用于操作的雄鱼可单独分缸养殖，不再接触雌鱼。养殖密度不宜过高或者过低。保证每天至少 2 次的活体饵料投喂。长期投喂不足，或冻存操作前进行过自然交配的雄鱼，精液的产量和质量都会受到影响，甚至收集不到。

斑马鱼精液收集的方法有 2 种：活体挤压收集精液和解剖收集精巢组织。在第一种方法中，操作的雄鱼可以继续存活，用于其他实验工作或反复用于冻存。采集精液的过程可见，可凭经验判断收集到的精液样品的质量。但是每次收集到的精液体量有限。一条身体健康，喂养良好的成年雄性斑马鱼，一次可体外收集精液 1-3 $\mu$ l 不等。在第二种方法中，雄鱼被杀死，不能继续使用。解剖出精巢后，组织在冻存液中充分研磨、分装、冻存保藏。一条雄鱼，一次可收获较大的样品量，数倍于活体收集，但样品质量不易由肉眼观察判断。

斑马鱼精子是体积较小的细胞。在超低温冻存操作中，不宜降温速率过慢。常用的降温速度为 4-5  $^{\circ}$ C/分钟。作为热带淡水鱼类，斑马鱼的精子在相对高盐度的环境下保持无受精活性状态（在实际操作中使用 Hanks Buffer 保存，见下）；接触淡水之后被激活，活力可维持 1-2 分钟。这段时间是接触卵子受精的最佳时间。

实验操作收集到的斑马鱼精液样品，如仅需短期保存（一周之内），可将样品直接溶于 Hanks Buffer 中，放置在 4 度条件下。在所有实验操作中，Hanks Buffer 的终溶液都

需在使用当天新鲜配置。如样品需长期保藏，则要将收集的精子样品溶于冻存保护液中，进行液氮冻存操作。

国家斑马鱼资源中心现在使用的超低温精子冻存方法，是以 Moens-Draper protocol 为基础，适应本地操作行程的操作流程。

## 第二节 斑马鱼精子冻存操作的实验细节

### 一、准备工作:

#### 1、 实验材料:

- 1) 250ml 烧杯 1 个（用于配置麻醉剂 Tricaine）
- 2) 海绵鱼托（固定雄鱼位置）
- 3) 解剖显微镜（带上光源，以鹅颈灯为佳）
- 4) 移液器（Drummond, Cat. No. 3-000-752）
- 5) 10 厘米毛细玻璃管（Drummond Scientific Company, Cat. No. 2-000-010, 提前做好标记）
- 6) 宽头镊子（Vetus, 33A-SA）
- 7) 2 毫升冻存管（Corning, Cat. No. 430488）
- 8) 15 毫升离心管（Falcon # 352099）
- 9) 10 微升一次性枪头
- 10) 泡沫盒 2 个（分别用于盛放液氮和干冰）
- 11) 防冻手套
- 12) 液氮罐
- 13) 脱脂奶粉（Boster Immunoleader 封闭蛋白干粉 Lot No:08E09A62, or Organic Valley/Organic Nonfat Dry Milk/ non-instant. grade A）
- 14) 35mm 塑料平皿

#### 2、 实验溶液配方

- 1) 麻醉剂 Tricaine 储液（pH7.0）

400 mg Tricaine（Sigma Cat. No. E10521）溶于 90 ml 水中，加入 2.1 ml Tris（1M, pH9.0）调节 pH，定容至 100 ml。4°C 短期储存，-20°C 长期储存。

使用时，将 4.2 ml tricaine 储液稀释于 100 ml H<sub>2</sub>O（终浓度 0.01%）。

## 2) 精子冻存液

### 2.1 10X Ginsberg Fish Ringers (w/o NaHCO<sub>3</sub>)

注意：按照顺序依次加入，避免产生沉淀。

400 ml 灭菌水中依次溶解：

NaCl	32.5 g
KCl	1.25 g
CaCl <sub>2</sub> •2 H <sub>2</sub> O	1.75 g

定容至 500 ml，过滤除菌，4 °C 储存。

### 2.2 10X NaHCO<sub>3</sub>（现用现配）：0.10 g NaHCO<sub>3</sub> 溶于 50 ml 灭菌水中。

### 2.3 1X Ginsberg Fish Ringer's mix（现用现配）

2.5 ml	10X Ginsberg Fish Ringer's
2.5 ml	10X NaHCO <sub>3</sub>
20 ml	ddH <sub>2</sub> O
总	25 ml

### 2.4 冻存液（当天配制）：充分混匀 20min

不含甲醇（Methanol）冻存液

1X Ginsburg Fish Ringers	10 ml（室温）
脱脂奶粉	1.5 g

含甲醇（Methanol）冻存液

注意：按照顺序，依次加入并充分混匀，避免产生沉淀。

1X Ginsburg Fish Ringers	9 ml（室温）
Methanol	1 ml
脱脂奶粉	1.5 g

## 3) 精子复苏液

### 3.1 Hanks 储液

Hanks 储液 1: 8.0 g NaCl, 0.4 g KCl 溶于 100 ml 灭菌水中，过滤除菌，4 °C 储存。

Hanks 储液 2: 0.358 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（无水），0.60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶于 100 ml 灭菌水中，过滤除菌，4 °C 储存。

Hanks 储液 4: 0.72 g CaCl<sub>2</sub> 溶于 50 ml 灭菌水中，过滤除菌，4 °C 储存。

Hanks 储液 5: 0.601 g MgSO<sub>4</sub> 溶于 50 ml 灭菌水中，过滤除菌，4 °C 储存。

### 3.2 Hanks Premix

10.0 ml	Hanks 储液 1
1.0 ml	Hanks 储液 2
1.0 ml	Hanks 储液 4
86.0 ml	ddH <sub>2</sub> O
1.0 ml	Hank's 储液 5

按照顺序依次加入，避免产生沉淀，无菌容器，4℃ 储存（使用期 6 个月）。

### 3.3 Hanks Final:

Hanks 储液 6: 0.35 g NaHCO<sub>3</sub> 溶于 10.0 ml 灭菌水中，现用现配。

9.9 ml Hanks Premix

0.1 ml Hanks 储液 6

总 10 ml.

## 二、斑马鱼精子冻存流程

### 1、精液收集

- 1) 标记毛细玻璃管：在距离底端 1.67 cm (3.3 ul) 处使用记号笔做上标记。
- 2) 使用麻醉剂将斑马鱼雄鱼麻醉。
- 3) 使用纸巾吸去鱼体多余水分（尤其是泄殖孔附近），安稳放置在海绵鱼托上。
- 4) 用宽头镊子轻轻挤压鱼腹收集精液。至 3.3 μl 最佳，至少应达到 1μl。以白色乳状液体为佳，如呈透明水状则为质量差样品。
- 5) 如果收集到的精液不足 3.3 μl，使用未加甲醇的冻存液配平至 3.3 μl。
- 6) 如果一条雄鱼收集到的精液不足 1μl，可继续挤压下一条相同基因型的雄鱼，混合精液到足够体积。

### 2、加入冻存保护液

- 7) 加入冻存保护液：吸取含有甲醇的冻存保护液 16.7μl，加入 3.3μl 精子样品至总体积 20 μl，轻轻吹打混匀（精液体积：冰存保护液体积=1:5）。
- 8) 分装到 2 个冻存管中，每管 10 μl，盖紧后放入 15ml 离心管中，干冰（-79℃）中预冷 20 min。
- 9) 20 min 后取出装有精液的冻存管，放入液氮速冻，在液氮罐中长期保存。

**注意：控制时间，精子样品从加入冻存保护液到放入干冰中时间尽量不要超过 60s；**

### 3、注意事项

- 10) 尽量安排上午时间进行冻存实验，精子质量相对好一些。
- 11) 实验过程中样品尽量避免引入过多的气泡。
- 12) 实验用雄鱼的年龄、营养状况、养殖环境和品系背景等均对精子质量有一定的影响，尽量使用年轻（6 个月到 1 年之间）的雄鱼，在实验前一个月左右加食喂养，有助于提高精子质量。



### 第三节 斑马鱼冻存精子样品的体外受精

#### 一、准备工作

- 1) 实验前一天下午配鱼，雌雄鱼以插板隔开。
- 2) 实验当天早晨，配置新鲜 Hanks buffer。
- 3) 设置好 33 °C 水浴。
- 4) 将冻存样品从储藏液氮罐中取出，放置在容易拿到的临时液氮盒中。

#### 二、鱼卵收集

- 5) 未受精鱼卵收集：捞取雌鱼麻醉，腹部吸干水份，放入 35mm 平皿中。
- 6) 轻轻挤压腹部，收集未受精卵，将鱼卵与鱼身分离后，雌鱼放回水中。

**注意：质量好的未受精卵呈金黄色、饱满、粘稠、透亮；颜色苍白、质地不匀、含有絮状物、缺少完整卵型等情况都属于坏卵，不能使用。**

- 7) 一只雌鱼产卵量少时，可混合 2-3 只雌鱼的卵。卵收集后，倒置平皿防止风干。鱼卵离开母体后要尽快使用，放置超过 5 钟的鱼卵表面已干燥，不再能接受精子受精，无法使用。

#### 三、复苏过程

- 8) 样品回温：将冻存管用镊子从液氮中取出，小心打开冻存管盖子（因超低温环境回暖，有时管内会有较大气压，要小心打开，避免受伤）。如管内有液氮，可谨慎倒出。将冻存管下半部迅速浸入 33 °C 水浴 8-10 s，加入 50  $\mu$ l Hanks buffer，吹打数下后加入未受精卵中，轻轻混匀。

**注意：操作过程一定要佩戴实验手套，接触冻存管时可用纸巾包裹，避免冻伤。**

- 9) 激活受精反应：加入~750  $\mu$ l 胚胎培养液（养殖水），轻轻混匀，室温放置 5 分钟后，加水至平皿的 2/3。
- 10) 平皿放入 28 °C 培养箱培养 3-5 小时后（以发育到 high stage 为佳）统计受精率，将受精卵挑出，转移到 10 cm 平皿中，以<50 枚/皿的密度静水养殖，前五天每天换液。

#### 4、注意事项

11) 雌鱼感应明暗光周期，在光周期开始后 1-3 小时为产卵状态，是每天收集鱼卵的唯一可行时间。光周期开始 3 小时后，雌鱼会在腹中降解已产生的鱼卵，即便收获鱼卵，也为坏卵，不适于冻存精子复苏受精。因此体外受精只能在光周期开始后的 1-3 小时（通常是早上）进行。

12) 操作体外受精前一天，应将雌鱼和雄鱼共同放置在配种缸内，用隔板隔开。这样有利于雌鱼进入产卵状态，但是不可让雄鱼和雌鱼相互接触。

13) 按压腹部挤出卵子的操作，对鱼有一定的伤害，操作频度不能超过半个月一次，最好为一个月一次或者间隔更久。挤过的雌鱼，一周后可用于自然配鱼产卵。

14) 冻存样品一经复苏后必须当即使用，不能再重新冻存和使用。

工作附表 1 精子冻存记录表

日期：

操作人：

样品编号	样品名称	放入干冰时间	取出干冰时间	精子量 (%)	雄鱼数	备注
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						

工作附表 2 体外受精记录表

日期：

操作人：

样品编号	样品名称	受精卵	未受精卵	受精率(%)	备注
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

## 第三章 斑马鱼的养殖

### 第一节 斑马鱼的养殖环境

斑马鱼的健康养殖是开展一切与斑马鱼相关研究工作的基础。养殖环境对斑马鱼的生长、发育以及繁殖至关重要。本节针对斑马鱼养殖过程中的主要环境参数进行了简单的总结归纳。

#### 一、 温度

斑马鱼是一种小型热带淡水鱼类，对生长温度有一定的耐受能力。最大耐受的溫度范围为6—38℃。目前，斑马鱼的实验室养殖水温一般控制在24℃至30℃，并且普遍认为28.5℃是最适合生长的温度，通常情况下鱼房室温控制在28℃左右[1, 2]。较高的养殖温度可能导致水体的溶氧度降低，且造成水体中细菌的滋生，影响斑马鱼的健康。而过低的养殖温度会造成斑马鱼的生长发育放缓，产卵量降低。

#### 二、 水质

##### 1、 pH

水体的pH值对鱼类的生长繁殖具有重要的影响。水体中pH低于6.0会造成斑马鱼死亡。相对而言，斑马鱼可耐受一定的碱性环境。有文献报道，斑马鱼野外自然群体生长的水环境pH在8.0左右[3, 4]。目前，仍然缺乏系统的实验结果确定斑马鱼生长繁殖的最佳pH值。大部分斑马鱼养殖设备维持水质pH值范围在7.0—8.0，这一范围不仅符合大部分淡水鱼类生活环境，而且是循环设备中生物膜生长适宜的环境。

##### 2、 盐度和电导率

斑马鱼属淡水鱼类，但是能够耐受很大的盐度范围。一般养殖系统的盐度控制范围为0.25—0.75‰，而斑马鱼养殖的适宜盐度通常控制在0.25‰左右[5]。

电导率是表示物质传输电流能力强弱的一种测量值。在一定温度下，养殖水的电导率与盐度存在相关性，所以，许多斑马鱼养殖设备通过监测电导率来控制水体中盐度。目前，斑马鱼养殖水中电导率的控制范围较广，在200—1700 μS/cm均有报道。一般情

况下，电导率主要控制在 500—800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  左右，此时，相对应的盐度在 0.25—0.50‰。

### 3、 硬度

水的总硬度指水中  $\text{Ca}^{2+}$ 和  $\text{Mg}^{2+}$ 等离子的总浓度。斑马鱼适宜于较高硬度的水，水体硬度超过 100  $\text{mg}/\text{L}$   $\text{CaCO}_3$  有利于斑马鱼的生长繁殖。但是，这种适应是有限的，养殖过程中硬度范围一般在 75—200  $\text{mg}/\text{L}$   $\text{CaCO}_3$ [5]。目前，尚没有系统全面的研究不同范围的硬度条件对斑马鱼生长发育方面的影响，但是有报道在较低的硬度的水中生存，斑马鱼的繁殖能力会降低。

### 4、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$

养殖水体中的氨氮主要来源于鱼的腮上皮组织释放、粪便排放、有机物（如死鱼，粪便，漂浮食物）的降解等。较高的氨氮浓度对鱼类有毒害作用，同时也会造成水体内的电导率升高。在养殖水中，氨态氮主要有两种存在形式，离子态  $\text{NH}_4^+$ 和非离子态  $\text{NH}_3$ 。养殖过程中，对鱼类存在毒性主要是  $\text{NH}_3$ ，一般情况下养殖水中  $\text{NH}_3$  的浓度要低于 0.02  $\text{mg}/\text{L}$ [5]。

水体中的硝化细菌可以将氨氮废物转化为亚硝酸盐（ $\text{NO}_2^-$ ），进而转化为硝酸盐（ $\text{NO}_3^-$ ）。因此，对于大型的循环水养殖系统，培养和维持水体内的硝化细菌水平对水体健康非常重要。水体中  $\text{NO}_2^-$ 浓度超过 1  $\text{mg}/\text{L}$  时，对鱼类的养殖存在危害[5]。较低浓度的  $\text{NO}_3^-$ 对鱼类基本无害，但是浓度超过 200  $\text{mg}/\text{L}$ ，就可能对斑马鱼的健康造成影响[5]。因此，监控水体中的氨氮水平，和硝酸盐浓度对维持一个健康的养殖水系是很重要的。

### 5、 溶氧

溶解氧是鱼类养殖中的重要条件参数。低水平的溶解氧往往会造成养殖系统内鱼类的大量死亡。斑马鱼具有较快的新陈代谢速率，因而消耗氧气的水平也比较高。建议养殖水体的溶解氧水平基本维持或者不低于 6.0  $\text{mg}/\text{L}$ （28.0  $^\circ\text{C}$ ），以维持斑马鱼的健康生长和活动。

然而，水体溶氧度也不是越高越好。水体通空气过度，会造成气体达到和超过饱和浓度，产生大量气泡，此时，鱼易得气泡病而死亡。

## 三、 光周期和光照强度

适宜的光周期有利于斑马鱼生长繁殖。斑马鱼在经历暗周期后，光照诱导斑马鱼开

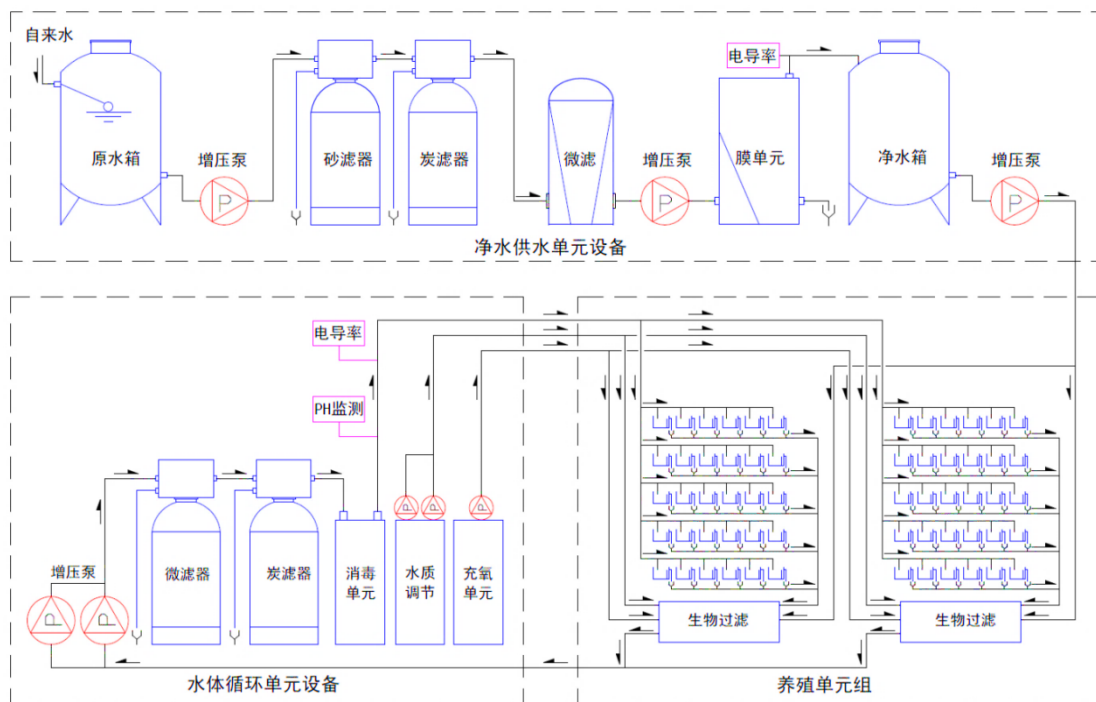
始交配产卵，并且交配产卵可以持续一小时左右。24 小时连续光照可能导致斑马鱼不产卵。

斑马鱼养殖系统的适宜光周期是 14 小时的光照周期和 10 个小时的暗周期。同时，照明系统的渐亮和渐暗可以避免刺激斑马鱼，防止斑马鱼从养殖缸内跳出。

斑马鱼养殖的合适光强范围为水体表面的光强在 54—324 lux 范围内[6]。光照强度过高会导致水体内的藻类大量滋生，影响斑马鱼的健康。鱼房内灯光太暗，光照不足，会造成斑马鱼的条纹灰暗，活力不足。

## 第二节 循环养殖设备介绍

斑马鱼规范养殖系统由以下相关设备组成，主要包括：净水供水系统、净水储存及水质控制系统、斑马鱼中央循环养殖系统等（图 3.1）。下面依次做出介绍。



**图 3.1 斑马鱼规范养殖系统水体流程图。**斑马鱼规范养殖系统的水体流程主要由净水供水系统、水体循环单元（净水储存及水质控制系统和自动化控制及报警单元）、中央循环养殖系统组成。

## 一、净水供水系统

净水供水系统主要是通过物理过滤、活性炭过滤和反渗透膜过滤对供水的水质进行有效的净化，去除水中可能含有的泥沙、铁锈、细菌、悬浮物、藻类、大分子有机物等多种有害物质，制造适合于斑马鱼养殖的净水。

经净水供水设备净化后的水质应满足如下要求：

脱盐（Salt rejection） 95 - 98%

有机分子截留（Organic rejection） > 150MW

除菌（Bacteria rejection） 99%

除颗粒物（Particle rejection） 99%

电导率（Conductivity） < 30  $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

## 二、净水储存及水质控制系统

净水供水系统生产的净水在温度、pH 和盐度等方面不适宜斑马鱼的生长繁殖。净水储存及水质控制设备能够自动调控净水水质，使水质符合斑马鱼生长繁殖的要求。经调控后的养殖水可以向斑马鱼循环养殖设备补充新鲜的养殖水。该设备主要包括水处理单元和水循环动力单元。

水处理单元具有实时监测和调控净水的温度、pH 及盐度等水质参数的功能。经处理后的水质符合斑马鱼养殖水水质的要求。

水循环动力单元驱动净水循环，保证净水的温度及理化性质的均一性。

## 三、斑马鱼中央循环养殖设备

斑马鱼中央养殖系统能够通过自动化控制为斑马鱼的生长繁殖提供适宜、稳定的和可循环的水环境，支持大规模、多品系的斑马鱼养殖。系统主要包括养殖水处理单元、水循环动力单元、斑马鱼养殖单元和自动化控制及报警单元等。

### 1、养殖水处理单元

食物残渣和鱼类排泄物会导致斑马鱼养殖系统的水质变差，影响斑马鱼的健康。养殖水处理单元具有净化斑马鱼养殖水的功能。该设备主要包括物理过滤单元、生物净化单元、杀菌单元及水质调控单元。



#### a、物理过滤单元

物理过滤单元可以有效地去除养殖水体中的悬浮颗粒及其它有害废弃物。该单元由固定过滤筛和活性炭过滤筛组成。在循环水养殖过程中，鱼类的粪便、及其所食饵料的 20-60%最终以固体废弃物的形式排入水中，其中约一半以上是悬浮性固体颗粒物，是养殖水体污染物的主要来源。固定筛过滤筛网能够有效过滤水体中直径 $\geq 50\mu\text{m}$  的固体颗粒。活性炭过滤筛能够有效地将养殖水体中的有机物质杂质吸附到活性炭颗粒内，从而达到去除有机物质的目的。但时间一长，活性炭的吸附能力会不同程度地减弱，吸附效果也随之下降。如果养殖水质混浊，有机物含量高，活性炭很快就会丧失过滤功能。所以，活性炭应定期清洗或更换。活性炭颗粒的大小对吸附能力也有影响。一般来说，活性炭颗粒越小，过滤面积就越大。所以，粉末状的活性炭总面积最大，吸附效果最佳，但粉末状的活性炭很容易随水流入水族箱中，难以控制，很少采用。颗粒状的活性炭因颗粒成形不易流动，水中有机物等杂质在活性炭过滤层中也不易阻塞，其吸附能力强，已经广泛地被使用在斑马鱼循环养殖系统。

#### b、生物净化单元

在溶氧充足的水体中，养殖水体中的氨在氨化细菌的作用下，进行有机氮化合物的脱氨基作用，生成氨态氮，即氨化作用；氨氮在亚硝化单胞菌和硝化单胞菌的作用下，使氨氮转化成亚硝酸盐再转化成硝酸盐的过程，即硝化作用。目前，常用的方法是在生物过滤器上附着生物膜进行脱氮。生物膜是一稳定的、多样的微生物生态系统。悬浮于液相中的有机污染物及微生物移动并附着在载体的表面上；然后附着在载体上的微生物对有机物进行降解，并发生代谢、生长、繁殖。生物膜反应器分为固定床和流化床两类。在固定床中生物膜载体固定不动，在反应器内的相对位置基本不变；在流化床中生物膜载体不固定，在反应器内处于连续流动的状态。生物流化床，生物膜载体在高速水流和气流或机械搅拌作用下不断运动（搅动、流化、循环等）的生物膜反应器。斑马鱼循环养殖系统中最常用的是固定床生物滤器。

#### c、杀菌单元

斑马鱼循环养殖系统通常使用紫外灯杀菌。紫外灯发射波长在 200-300nm 范围的紫外线，都有杀菌能力。其中以 265-266nm 的杀菌力最强，在波长一定的情况下，紫外线的杀菌效率与强度和时间的乘积成正比。可以穿透细菌的细胞膜，被细胞核吸收，对细

菌 DNA 造成损伤，抑制了 DNA 的复制，破坏了菌体的繁殖能力，从而达到了杀菌的目的。但是紫外线杀菌需要穿透水层才能起作用，因为污水中的悬浮物、浊度等都回干扰紫外光的传播。所以养殖水的水质是保证紫外线消毒的先决条件。

#### d、增氧单元

充气式增氧是目前规范化养殖中应用较多的一种方法。用空气压缩机将空气或纯氧通过气石等散气装置，释放为小的气泡，小气泡与水进行传质，将氧慢慢溶于水体中，成为溶解氧。

### 2、水循环动力单元

水循环动力单元能够为斑马鱼养殖水体的循环提供基本的动力。水循环动力单元需具有水流旁路，能够在不关闭主水泵情况下进行系统维护（例如更换 UV 灯管，清洁 pH 探头和更换过滤器等）；主水泵提供的水循环速率应满足每个养殖缸的水被更换次数不少于 5 次/小时；系统必须有备用水泵。在主水泵不能工作时，备用水泵能够立刻自动工作；所有主水泵和备用主水泵有减震设计。

### 3、自动化控制及报警单元

#### a、水质调控单元

水质调控单元具有实时监测和调控斑马鱼养殖水的理化性质。调控的基本项目有：溶氧度、盐度、温度、pH 值。保证这些水质指标都控制在养殖对象的适应范围内。一般要求斑马鱼养殖水体的溶氧不低于在 6.0mg/L 之间，pH 值在 7-8 之间，电导率在 500-800 $\mu$ S/cm。养殖系统对于以上指标应能够实时自动监测，发现某个指标异常，须即时自动调整。

#### b、报警单元

具有监控报警功能。当养殖系统中仪器不能正常工作，或者养殖系统水质超出设定范围时，能够自动报警；当养殖系统中仪器不能正常工作时，自动化控制单元能够自动启动备用仪器；自动指令对水体循环净化水仪器补水的功能。

### 4、斑马鱼养殖单元

该单元主要包括斑马鱼养殖架和放置其中的养殖缸。养殖架的制作采用坚固和耐腐蚀的材料。机架可根据斑马鱼房地面坡度进行调节；养殖架整体及各层都能实现水流量控制。给排水管道（含阀门）易于维修和更换。养殖缸的制作采用优质塑料（例如

Polycarbonate, Polysulfone) 注塑成型。养殖缸能够防止斑马鱼逃逸 (含成年斑马鱼和斑马鱼鱼苗)。

### 第三节 斑马鱼的繁殖

斑马鱼一般在 3—4 月龄进入性成熟期，而 5—14 月龄的斑马鱼的繁殖能力较强。斑马鱼在合适的温度下一年四季都可以产卵，同时斑马鱼的交配行为需要光周期的生物钟控制，在每次光周期开始时应激进入交配产卵的状态。此时雌雄鱼相遇则有可能交配产卵。一对健康的斑马鱼一次交配可产受精卵 200 枚以上。斑马鱼所产的卵为非黏性卵，直径大约在 1 mm 左右，沉积于缸底。

下面将详细介绍斑马鱼如何在实验室中的繁殖方法以及胚胎的养殖。

#### 一、配鱼

1、为了提高斑马鱼的产卵量，必须在交配前 1-2 周对亲鱼增添鲜活饵料。

2、配种当天下午，准备装满养殖水的一套配种缸，包括内部的产卵框（内框）和外缸。将雌、雄按 1:1 或 2:1 比例放入内缸，密度不易过高，并用隔板将雌鱼和雄鱼分开，盖上盖子防止鱼跳出（图 3.2）。雌雄区别：雄斑马鱼腹部扁平体型细长，体色偏黄；雌斑马鱼腹部膨大体型丰满，腹部银亮。

3、将交配盒放置在 28°C 下，避光过夜。

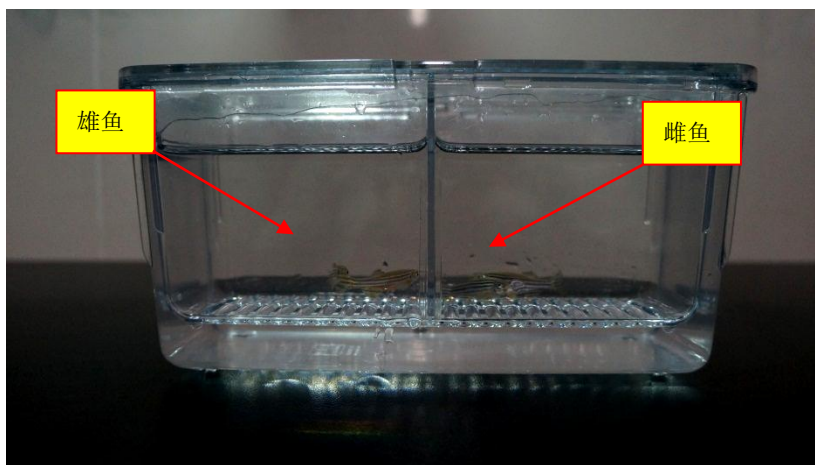


图 3.2 配鱼

## 二、受精和收卵

1、次日早上给予光照，将配种内框（内有斑马鱼）小心地转移到事先准备好的装有少量系统水的配种外缸内，然后去除隔离板。斑马鱼开始交配。交配期间，尽量避免干扰。

2、待亲鱼产卵，取 180  $\mu\text{m}$  孔径的过滤网，收集外缸底部的鱼卵，并用养殖水清洗鱼卵 2-3 次。

3、放置胚胎到装满养殖水的平皿内，对于直径为 8 cm 的平皿，密度在 50 个鱼卵/皿为宜。然后清除异物和未受精的鱼卵。

## 三、胚胎的养殖

1、胚胎盛养于装有亚甲基蓝(0.5 mg/L)养殖水的平皿中，避免霉菌生长(图 3.3)。

2、将装有胚胎的平皿做好标签，置于设有光周期的28.5 °C的恒温培养箱或养鱼房中培养，每天吸出死卵或胎膜，并换水一次。注：换水的水温相差不宜过大，要保持相对恒定，剧烈的温度变化会引起胚胎死亡。

3、在1—4 dpf期，胚胎会发育至幼苗并出膜，此期间幼苗游泳能力弱，无需喂食。

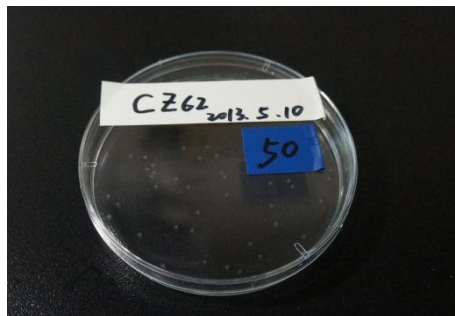


图 3.3 培育于平皿中的 0-4 天胚胎

## 第四节 幼苗及幼鱼的养殖

斑马鱼在5—15dpf阶段为幼苗期，幼苗期斑马鱼对环境非常敏感，所以此阶段的养殖是影响斑马鱼存活率的重要环节。16—90dpf为幼鱼期，根据养殖方式的不同，将斑马鱼幼鱼期分为两个时期，幼鱼初期（15—30 dpf）、幼鱼后期（31—90 dpf）。下面将

介绍以上三个时期的养殖方式。

### 一、 幼苗期（5—15 dpf）

幼苗期（5—15 dpf）采取的是静水养殖，此时幼苗转移至1000 mL的小圆缸里养殖，小圆缸内缸底部带有过滤网，方便换水，将标签贴于内缸外侧（图 3.4）。养殖密度一般为50尾/L，不超过100尾/L。每日投喂3—4次，以草履虫为主要饵料，幼苗粉末饲料为辅。草履虫的投喂次数不低于每日2次，每次投喂后确保小圆缸里草履虫的密度超过100个/mL。粉末饲料投喂需严格控制量，投喂量大则残渣会在水中形成絮状物，对于游泳能力弱的幼鱼来说，容易被缠住而死亡。所以，如投喂粉末饲料过多，则需每日及时用吸管吸出残渣。

每日养殖水全部更换一次，换水时将内缸缓慢提起，再轻轻放入含有新鲜养殖水的外缸里，注意保证换水前后水温一致，剧烈的温差变化易造成幼苗死亡。在第12 d后，每日可适当的加入活饵丰年虫，观察幼苗是否主动摄食丰年虫。一般14—15 d，90%以上的幼苗具备摄食丰年虫的能力。

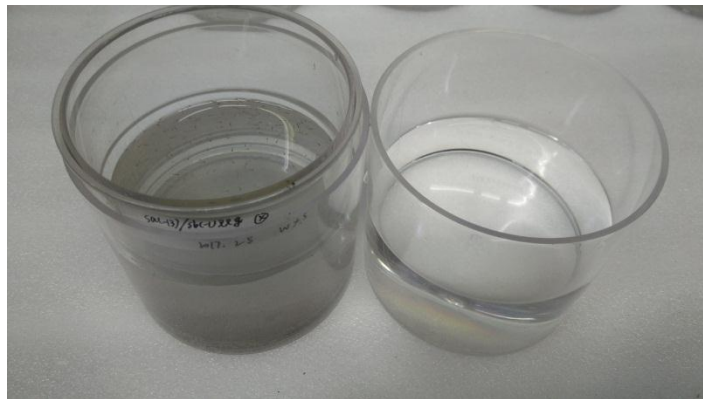


图 3.4 小圆缸里静水养殖5—15 dpf期幼鱼

### 二、 幼鱼初期（16—30 dpf）

幼鱼初期（16—30 dpf）采取的是滴水法换水养殖（图 3.5）。

在这个时期，幼鱼游泳能力相对较弱，过大的水流不利于幼鱼的生长。待幼鱼能摄食活饵丰年虫后，将幼鱼转移到干净的3 L鱼缸中，贴好标签。在鱼缸中插入鱼苗网格（40目以上）插板，置于鱼苗养殖架上，不需要盖盖，采取滴水法换水（以每分钟100滴左右进水为宜）。养殖密度一般情况下不超过30尾/L。每日投喂2—3次丰年虫，投喂前关闭水阀。每次喂食的丰年虫不宜过多，以5分钟内可以吃完的量为准，丰年虫过多后沉底

易败坏水质。每日可搭配1次人工合成的幼鱼粉末饲料进行投喂。



图 3.5 滴水法换水养殖15—30 dpf期幼鱼

### 三、幼鱼后期（31—90 dpf）

幼鱼后期（31—90 dpf）采取的是流水法换水养殖（图 3.6）。将幼鱼分缸，每缸密度不超过10尾/L，贴好标签。在鱼缸中插入鱼苗网格（20目）插板，置于鱼苗养殖架上，需要盖盖，采取流水法换水（以10 L/h左右流速为宜）。每日投喂2—3次丰年虫，投喂前关闭水阀。每次喂食的丰年虫不宜过多，以5分钟内可以吃完的量为准。每日可搭配1次人工合成的幼鱼粉末饲料进行投喂。丰年虫喂食可使用“定量分液喂食器”人工投喂（图 3.7）。



图 3.6 流水法换水养殖31—90 dpf期幼鱼



图 3.7 采用“定量分液喂食器”喂食丰年虫

## 第五节 成鱼的养殖及安乐死

在斑马鱼的整个生活史中，成鱼时期持续时间最长。从而成鱼的养殖成本比重较大，所以，在满足科研需求的前提下，合理、健康的投喂方式尤为重要。对于使用后的斑马鱼应该妥善处理，是实验动物伦理学的要求。下面介绍成鱼的养殖及斑马鱼安乐死。

### 一、成鱼的养殖 (> 90 dpf)

一般情况下，当幼鱼达到 3 月龄时，均已经成年，并具备繁殖能力。将斑马鱼转移至成鱼养殖区，同时鱼缸插板换成成年鱼插板。记录移入成鱼缸中的斑马鱼数目，养殖密度为 5—8 尾/L，在养殖缸外贴黄色标签，在上注明缸中鱼的实际数目（图 3.8）。每日按成年鱼喂食标准给予喂食丰年虫 2 次、颗粒饲料 1 次。对于需要繁殖的种鱼、精子冻存的雄鱼等，每日可加喂 1—2 次丰年虫，增加产卵量和精液量。及时清洁未吃完的食物残渣，以及每日巡视捞去死鱼。

成鱼阶段的养殖时间相对较长，在这个阶段鱼缸内表面会长藻、霉等，所以要定期清洗消毒。



图 3.8 成年斑马鱼养殖

### 二、斑马鱼安乐死

斑马鱼的自然寿命是 2—5 年，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 种：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。

## 第六节 斑马鱼活饵的培养

斑马鱼养殖过程中，活饵的培养是必不可少的环节。在幼鱼初期，常用的开口活饵为草履虫、轮虫等，在幼鱼后期至成年，丰年虫、丰年虾等活饵较为常见。下面主要介绍草履虫的培养及丰年虫的孵化方法。

### 一、草履虫培养

#### 1、草履虫种源的培养

##### a、培养液配制

- 1) 在 1 L 纯水中加入 0.20 g  $\text{NaHCO}_3$  后，湿热灭菌。
- 2) 称取 0.25 g 酵母粉放入 1.5 mL 离心管中密封，干热灭菌。
- 3) 将 10—15 枚小麦粒放入灭菌管（见图 3.9）中，同时加入少量纯水浸没麦粒，湿热灭菌。



图 3.9 灭菌水、小麦粒、酵母



4) 待上述灭菌结束后，静置至室温，在无菌操作台中，将灭菌酵母加入含  $\text{NaHCO}_3$  的灭菌水中混匀。即配制成 0.25 g/L 酵母培养液。

#### b、草履虫接种

1) 在无菌操作台中，将酵母培养液按每瓶 120 mL 分装到无菌培养瓶中(图 3.10)，同时在每一个培养瓶中加入 1—2 粒灭菌过的小麦粒。

2) 将事先准备好的草履虫种源(可在 CZRC 购买)，接种 10—20 mL 到培养瓶中，确保草履虫密度不低于 25 个/mL(密度统计方法见 2.4)。将接种好的培养瓶放入恒温培养箱中，15°C 长期培养(1—3 个月)。

3) 需要种源时，将草履虫培养瓶从 15°C 培养箱中拿出，按照 1:1 接入新鲜灭菌培养液，并放置 28°C 恒温培养箱中培养 3—7 天。

4) 选择草履虫密度高(> 1000 个/mL)、运动快、生命力旺盛的培养瓶作为种源。



图 3.10 无菌培养瓶

## 2、草履虫高密度培养

### a、培养液配制

在 1 L 纯水中分别加入 0.25 g  $\text{NaHCO}_3$ 、0.2 g 葡萄糖、0.5 g 酵母粉后密封，70°C 烘箱中烘 2—3 h 后放置室温待用，培养液 pH 范围为 7.0—7.5。

### b、草履虫接种

1) 将草履虫种源，按照 1:2 的比例接种，即 100 mL 草履虫种源接种到装有 200 mL 新鲜培养液的玻璃平皿(图 3.11)中。

2) 将平皿放置 28°C 恒温培养箱中培养 3—7 天，每日统计平皿中草履虫的密度。最高密度可达 2000 个/mL。

3) 培养过程中若培养液由浑浊变清，且密度较低时，可适量的补充新鲜酵母浓度较高的培养液。密度达到 2000 个/mL 左右时，可以按照 2.3 进行富集浓缩，或重复上述步骤 1 接种。此时，草履虫属于开放培养存在污染其它单细胞生物的可能，所以不能作为种源。

4) 将培养温度提高到 30—35°C 范围内，可加快草履虫的繁殖速度。另外，在平皿中加入 1—2 枚灭菌过的小麦粒可以提高草履虫密度。

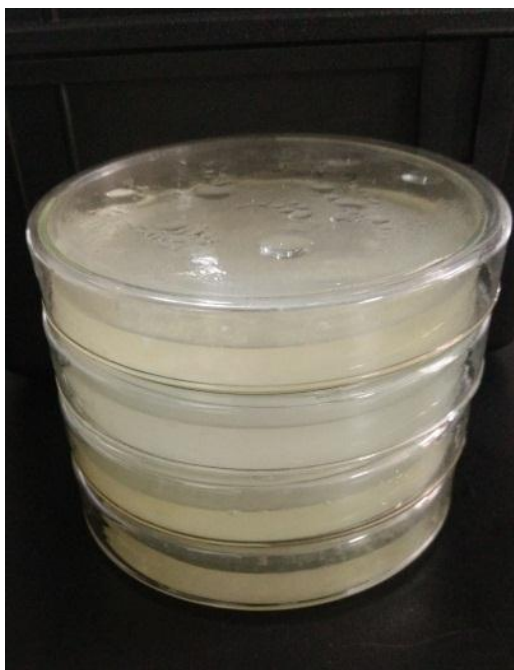


图 3.11 玻璃平皿培养草履虫

### 3、 草履虫的富集浓缩

统计草履虫的密度，当密度 > 2000 个/mL 时，可进行富集浓缩。富集步骤如下：

- a、用 120 目的过滤网过滤培养液，此时大部分草履虫都在过滤液中，收集过滤液。
- b、将收集的过滤液倒入 500 目过滤网中进行过滤，收集过滤液。此时滤速较慢，可以轻轻地震荡过滤筛，加速滤过速度。
- c、将收集的过滤液倒入 1250 目过滤网过滤，此时，草履虫富集在过滤筛上，弃掉过滤液。用适量纯水轻轻冲洗过滤筛，并收集过滤筛上的草履虫，可重复冲洗 2—3 次得到干净的草履虫溶液。确定富集草履虫的密度，按照投喂后养殖水中草履虫密度大于 100 个/mL 进行投喂。

#### 4、草履虫密度统计方法

将待计数的草履虫培养液摇匀后，用移液枪取20 μL的草履虫培养液滴于载玻片上，在解剖镜下拍照计数，重复取样计数3次。当镜下视野中草履虫数目超过20个时，在载玻片上滴1滴0.1%冰醋酸杀死草履虫后拍照计数。

## 二、丰年虫的孵化

根据丰年虫卵的脱壳情况，孵化方法可以分为两种，脱壳孵化法和未脱壳孵化法，下面主要介绍常见的未脱壳孵化法（图 3.12）。



图 3.12 丰年虫孵化和收集好的丰年虫

### 1、材料

去氯自来水，或双蒸水；海盐；食用级小苏打（ $\text{NaHCO}_3$ ）；未脱壳丰年虫卵；丰年虫卵孵化器；增氧泵；105 μm 孔径的过滤筛。

丰年虫卵的孵化量要根据斑马鱼养殖规模确定，如果以 12 L 孵化体系计，还需以下材料：12 L 的去氯自来水，或双蒸水；200 ml 海盐；9 g 食用级小苏打；60 ml 的未脱壳丰年虫卵。

### 2、步骤

- 将丰年虫卵孵化器放置在 24 小时光照和 24—28 °C 室温条件下。
- 向孵化器中加入 12 L 去氯自来水或净水、200 ml 海盐和 9 g 食用级小苏打。
- 待海盐和小苏打充分溶解后，加入 60 ml 的未脱壳丰年虫卵。

d、根据丰年虫孵化体积，选用适当功率的增氧泵向孵化器内连续充气 18—24 小时。将增氧石放置在孵化器的底部，调节增氧泵至适当的充气强度，避免剧烈充气。

e、孵化 18—24 小时后，停止充气。静置适当的时间（约 15 min）后，孵化的丰年虫会沉积在孵化器的底物，卵壳会漂浮在溶液的表面。

f、打开孵化器底部的阀门，收集沉积在底部的丰年虫。切勿收集表层的卵壳。

g、用 105  $\mu\text{m}$  孔径的过滤筛过滤收集丰年虫。然后用系统水清洗过滤收集的丰年虫 2-3 次。将清洗后的丰年虫重新悬浮到 1L 的系统水或净水中，混匀后喂斑马鱼。

## 参考文献

1. Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5rd edition. 2007: University of Oregon Press. 385 pp.
2. Matthews, M., B. Trevarrow, and J. Matthews, *Avirtual tour of the guide for zebrafish users*. Lab Anim, 2002. **31**: p. 34–40.
3. Spence, R., et al., *The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh*. . J. Fish Biol., 2006. **69**: p. 1435–1448.
4. McClure, M.M., P.B. McIntyre, and A.R. McCune, *Notes on the natural diet and habitat of eight danioin fishes, including the zebrafish Danio rerio*. J. Fish Biol., 2006. **69**: p. 553–570.
5. Lawrence, C., *The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review*. Aquaculture, 2007. **269**: p. 1-20.
6. Matthews, M., B. Trevarrow, and J. Matthews, *A Virtual Tour of the Guide for Zebrafish Care and Users*. Lab Animal, 2001. **31**: p. 34–40.

## 第四章 斑马鱼常见鱼病及健康维护

鱼病种类很多。按照发生原因的不同，大体分为两类：一类是非感染性疾病，一类是感染性疾病。两类疾病对斑马鱼的健康均可形成严重的危害。其中以感染性疾病造成的危害较为严重，常常可形成大规模的爆发或感染，严重影响斑马鱼的质量和实验结果的准确性。斑马鱼属于鲤科鱼类，故感染鲤科鱼类动物的病原均有可能感染斑马鱼。本章将对斑马鱼中常见疾病及日常健康维护做一个简单的介绍。

### 第一节 细菌性疾病

#### 一、分支杆菌感染

**1、病原：**海分支杆菌(*M. marinum*)、龟分支杆菌(*M. Chelonae*)、偶发分支杆菌(*M. Fortuitum*)、和嗜血分支杆菌(*M. Haemophilum*)等[1]。分支杆菌属细菌一般不易着色，需要进行抗酸性染色。其中海分支杆菌以及嗜血分支杆菌是一种非常严重的人畜共患病原，在斑马鱼鱼房内出现过传播和人员感染，造成巨大的损失[2]。

**2、临床症状：**病鱼往往出现体表溃疡、出血、头部周围充血，卵巢所靠近部位的体表溃烂。内脏器官会有白色结节出现，有时也会有腹水出现（图 4.1）。

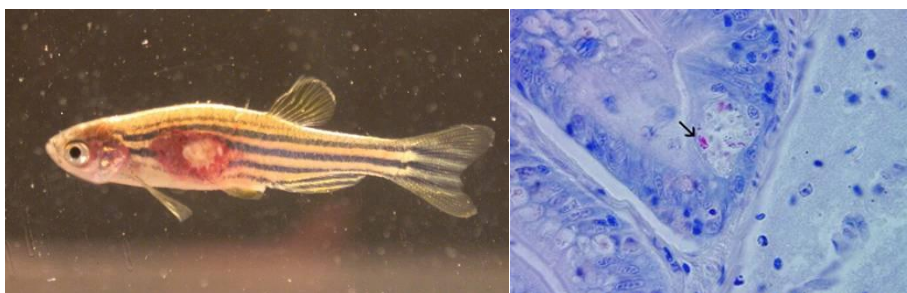


图 4.1 分支杆菌感染病征与病理图。左侧，检出过分支杆菌的体表溃烂斑马鱼，右侧分支杆菌感染鱼肠道切片的抗酸染色（分支杆菌为抗酸菌染色呈红色，非抗酸菌染色呈蓝色）（引自：<http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

**3、显微观察与诊断：**诊断时根据上诉症状，取内脏中的小结节做涂片，进行抗酸染色后如发现长杆形的抗酸菌，基本就可以确诊。也可根据分支杆菌 16S rDNA 基因保守序列设计引物，分离分支杆菌，PCR 扩增一段特异性片段，分子方法鉴定[3]。

**4、防治：**一般来说分支杆菌感染很难用抗生素进行根治，有文献报道 50 ppm 卡拉

霉素对其有一定的控制作用[4]，也有实验室采取高浓度的次氯酸钠（100 ppm）或者聚维酮碘溶液（1000 ppm）消毒胚胎的方法来去掉分支杆菌[2]。此外，优化饲养条件对其预防也有一定作用。

## 二、鱼鳔炎(aerocystitis, 鱼鳔细菌性感染)

1、病原：细菌和真菌感染都时有报道，不能确定其具体的细菌类型，也有报道称在患有鱼鳔炎的病鱼中发现有荧光假单胞菌[5, 6]。

2、临床症状：行动缓慢，鱼背鳍和腹鳍根部有红色出血点（图 4.2）。

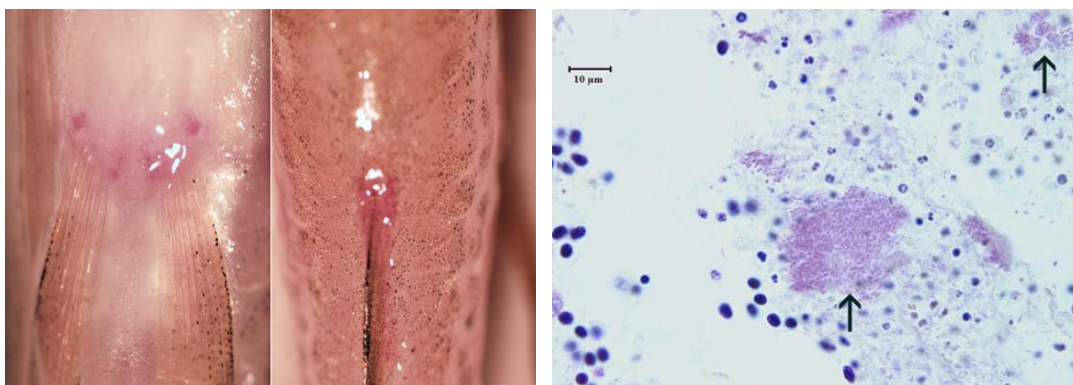


图 4.2 鱼鳔细菌性感染的病理图。左侧鱼鳔感染细菌后腹鳍和背鳍出现红斑；右侧，患有鱼鳔炎的病鱼的鱼鳔切片革兰氏染色，箭头处可见大量革兰氏阴性菌（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

3、显微观察与诊断：鱼鳔出现大范围损伤和严重慢性炎症。鱼腹鳍有红色斑点，组织切片可见明显坏死，革兰氏染色可见大量细菌群落[7]（图 4.2）。

4、防治：由于目前鱼鳔炎的病菌及致病机理尚未清楚，所以尚无较好的治疗方法。遇到病鱼及时隔离。养殖密度过大往往会导致鱼鳔炎发生。

## 三、其它几种革兰氏阴性菌感染

1、病原：嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、河弧菌生物变种(*Vibrio fluvialis*)、产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)、荧光假单胞菌(*P. Fluorescens*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)、水型点状假单胞菌(*Pseudomonas punctatata f. ascitae*)、类志贺邻单胞菌(*P. Fluorescens*)等属，均为条件型致病菌，这些病原往往会引起斑马鱼细菌性败血症，细菌性肠炎、腹水以及竖鳞病等[8]。

**2、临床症状：**体表鳞片竖起或者体表及内脏充血，出血，突眼，腹部膨大，有淡黄色或红色腹水，肝、脾、肿大，脾紫黑色，有时会有鳍的末端腐烂，鳞片脱落(图 4.3)。

**3、显微观察与诊断：**显微镜下可见红细胞肿胀，有时发生溶血。在病鱼腹水或者内脏检出嗜水气单胞菌，分离培养细菌并PCR确诊。

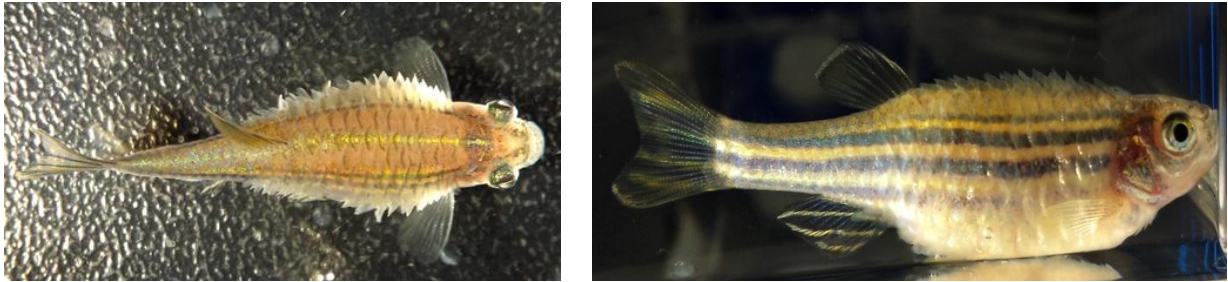


图 4.3 竖鳞病斑马鱼 游动缓慢，无力，体表粗糙，鳞片竖起，腹部膨大有腹水，眼睛突出。

#### 四、爱德华氏菌感染

**1、病原：**爱德华氏菌 (*Edwardsiella ictaluri*)，为非条件性致病菌。主要传播方式是通过与带病原菌的鱼相接触[7, 9]。

**2、临床症状：**病鱼皮肤表面有多个出血点。

**3、显微观察与诊断：**切片染色可见病鱼内部多个脏器（肾，脑）等组织出现坏死及大量炎症[10]。具体诊断可于病兆部位分离出病原菌，分子检测确诊（图 4.4）。

**4、防治：**该病原在斑马鱼上尚未发现过大规模传染。一般及时隔离发病鱼，做好鱼卵的消毒工作可以在一定程度上控制该疾病。

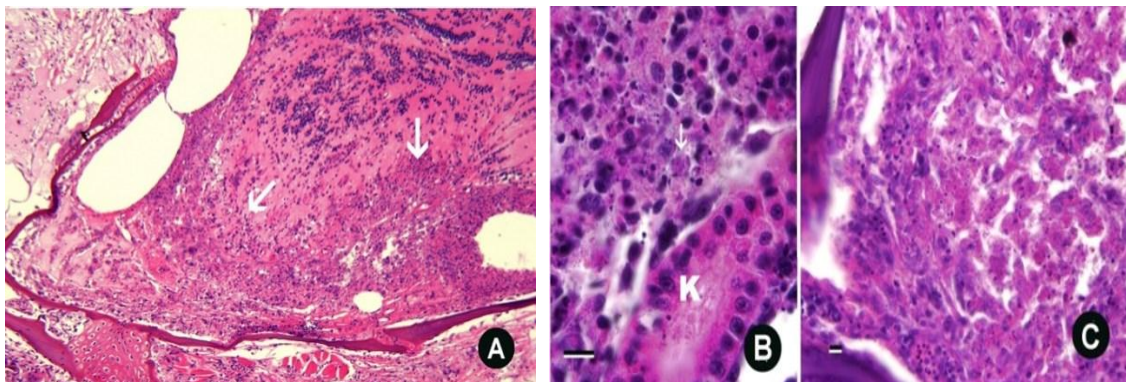


图 4.4 爱德华氏菌感染斑马鱼病理图。A 图箭头所指为斑马鱼脑部组织感染爱德华氏菌产生的炎性坏死。B 图为肾脏组织感染爱德华氏菌切片染色图。箭头所指为包含有菌的巨噬细胞。K 为肾小管组织。C 图为病鱼鼻腔组织感染爱德华氏菌产生大量的炎性坏死图。（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

## 第二节 寄生虫疾病

### 一、噬神经微孢子虫感染

1、病原：微孢子虫（*Microsporidium*）属于微孢子门，特定种属名：*Pseudoloma neurophilia*，孢子呈梨形或者卵圆形，孢子小，内部构造需在电镜下才能看清楚。专性细胞内寄生，复杂生命周期，产生具有传染性和抵抗性的孢子，通过摄入具有传染性的孢子感染。潜伏期长，发病时间慢[11]。

2、临床症状：病鱼瘦弱，无光泽，有时脊柱弯曲。而一些外表正常的鱼也可能存在微孢子虫的潜伏性感染[12]（图4.5）。

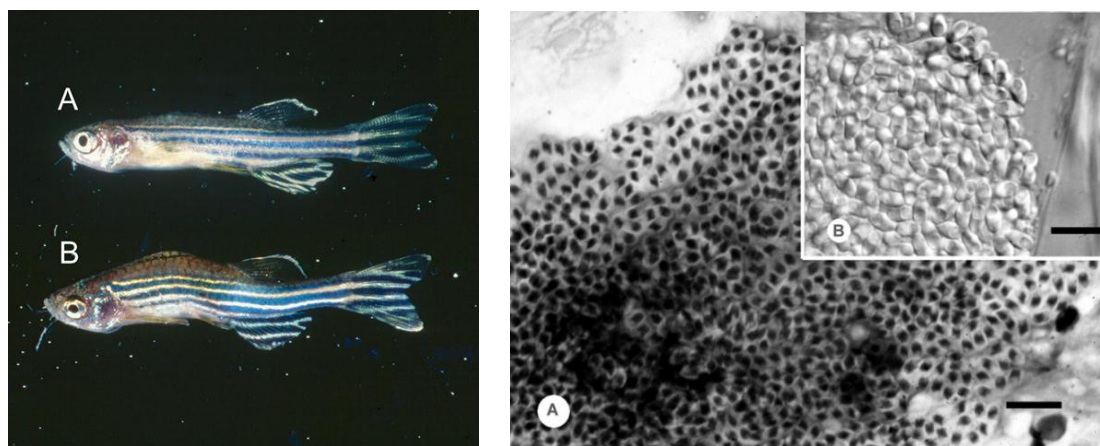


图4.5 噬神经微孢子虫感染斑马鱼的病征及病理图。左侧，A鱼：微孢子虫感染导致体型瘦弱；B鱼：微孢子虫感染导致脊柱侧弯；右侧，A：头部组织的微孢子虫吉姆萨染色；B：微孢子虫湿片的超微结构。（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

3、显微观察与诊断：中枢神经系统（脊髓和后脑）可见孢子（湿片或切片），革兰氏染色和抗酸性染色均可以用。病鱼脑部及肾脏组织的分子检测可以快速鉴定出微孢子虫感染[13]。

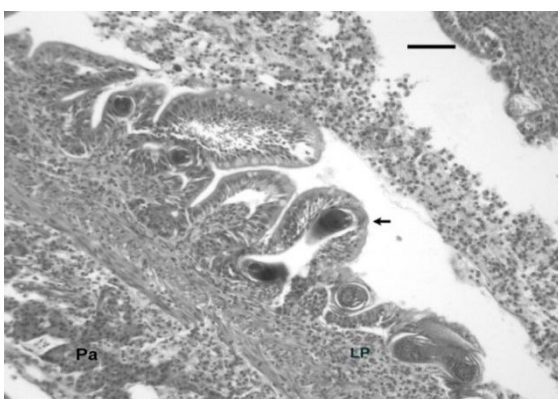
4、防治：①对微孢子虫较有效的控制手段是紫外线（UV）对水体进行照射，因此要保证养殖循环系统中有足够照度的紫外线消毒（ $>30,000 \text{ uw.s/cm}^2$ ），然而紫外线并不能完全去除掉微孢子虫孢子体[7]；②定期检查紫外灯的照度，及时更换紫外灯；③一旦发现不明原因导致的体型瘦弱的鱼要及时清除；④严格管理好品系斑马鱼，防止微孢子虫交叉污染。



## 二、毛细线虫感染

**1、病原：***Pseudocapillaria tomentosa*，为第一个被发现的感染斑马鱼的毛细线虫，具有广泛的宿主。属毛细科，卵生，卵随寄主粪便排入水中，开始分裂，形成幼虫，但幼虫并不出壳，鱼吞食含有幼虫的卵而感染。

**2、临床症状和病变：**病鱼发黑，瘦弱，毛细线虫以其头部钻入寄主肠壁黏膜层，破坏组织，引起肠壁发炎，剖检肝肿大和贫血（图 4.6）。此外，毛细线虫还可能会引发斑马鱼长瘤[14]。



**图 4.6 毛细线虫病鱼的病理图。**  
毛细线虫感染鱼体组织的切片观察，切片中可见毛细线虫（箭头）。  
（引自  
<http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

**3、显微观察与诊断：**肠道湿片显示充满特殊虫卵，组织切片见毛细线虫位于肠壁，感染组织严重蜂窝织炎；椭圆形、具有双极囊的卵存在；确诊还需要观察、分离虫体，分子检测确诊。

**4、防治：**①对该病的治疗通常采用伊佛霉素和左旋咪唑，目前这两种药物尚未在斑马鱼身上试用。②严格控制喂养斑马鱼的食物来源，因为食物中可能带有该病原[7]。

## 第三节 非感染性和先天性疾病

### 一、心脏病

**1、临床症状和病变：**外观上可见心脏区域异常肿胀，解剖后发现心脏严重出血或有大块的血块儿[7]。

**2、显微观察与诊断：**组织切片可见心室扩张，充满液体（图 4.7）。

**3、防治：**发病原因待定，尚无治疗方法。

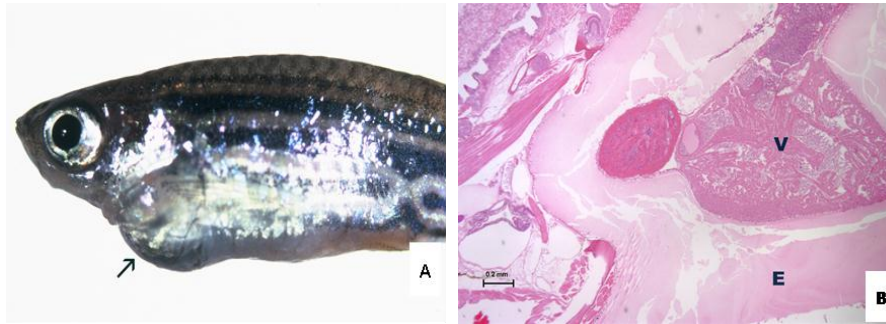


图 4.7 斑马鱼心脏病的病征与病理图。左侧，斑马鱼心包积液导致心脏外凸；右侧，心脏病斑马鱼组织切片。由图可见，心包腔囊肿，围心腔内有大量嗜酸性液体(E)，V区为心室（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

## 二、卵巢相关炎症

1、临床症状和病变：腹部膨胀扩张，卵巢成实心瘤状物。严重者甚至从内腔到体表出现出溃疡[7]（图 4.8）。

2、显微观察与诊断：组织学上可见严重慢性炎症，以及大量退化的卵。

3、防治：具体病因尚不清楚，可能是分支杆菌感染所致。猜测雌性斑马鱼未及时将卵排出可能是该病发生的一个原因，因此需要定期将雌鱼体内的卵排出。

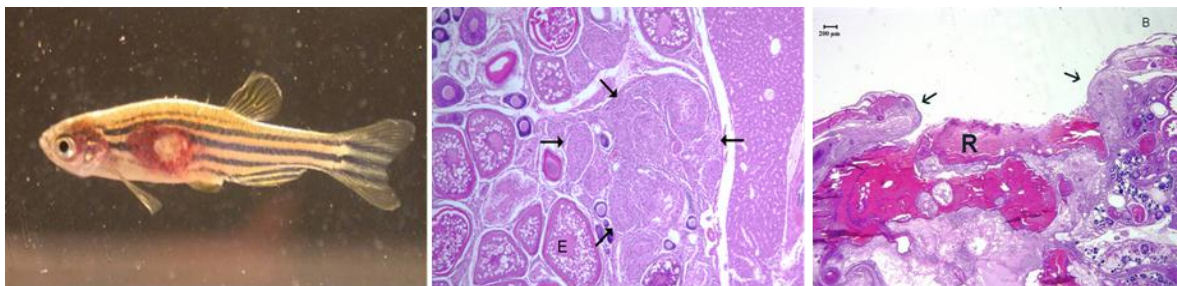


图 4.8 斑马鱼卵巢相关炎症的病征与病理图。左侧，斑马鱼卵巢炎，病鱼体侧形成相关炎症向外溃烂的白色溃疡；中间和右侧，卵巢炎斑马鱼的组织切片，其中，中间可见大量染成蓝色的炎性细胞碎片的出现（箭头）；右侧卵巢内可见许多退化的卵，而嗜酸性的卵黄碎片将扩增出体腔壁。E 为卵，R 为嗜酸性的卵黄碎片。（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

## 三、气泡病

1、病因：水中某种气体过饱和，一般越幼小的个体越敏感，可引起幼鱼大批死亡；常见于循环养殖设备中增氧泵故障，导致水体某种气体含量过饱和[7]。

**2、临床症状：**鱼最初因感到不舒服，在水面做混乱无力游动，不久在体表及体内出现气泡，随着气泡的增大及体力的消耗，鱼逐渐失去游动能力而浮在水面，不久即死，一旦发生，难以逆转（图 4.9）。

**3、诊断：**解剖及用显微镜检查，可见鳃、鳍及血管内有大量气泡，引起栓塞而死。

**4、防治：**气泡病是水体的气体过饱和所致，因此要对水体气体（例如氧气）含量进行实时准确检测，同时需要定期检修增氧泵等设备。



图 4.9 气泡病斑马鱼病征图。左侧，眼睛上方和鳃部出现气泡。右侧，气泡病致死的斑马鱼，鱼鳍上出现肉眼可见气泡。（引自 <http://zebrafish.org/health/diseaseManual.php>）

## 第四节 斑马鱼日常健康维护

近年来，越来越多的实验室都已建立了自己的斑马鱼鱼房。实验用斑马鱼在养殖与操作中存在的问题给斑马鱼鱼病的爆发和传播带来了一定风险，因此斑马鱼日常健康维护对斑马鱼各领域相关研究的顺利开展尤为重要，本节对斑马鱼日常健康维护的相关工作做一个简单的介绍。

### 一、外来及引进鱼隔离管理

1、各斑马鱼鱼房都应建立在位置独立于主鱼房的外部隔离鱼房或者不同于主养殖系统的隔离鱼架。所有从外面引进鱼都必须在外部分离鱼房或者隔离鱼架进行隔离[8]。

2、引进鱼隔离管理：各实验室应该严格做好引进鱼管理工作，对于放在隔离鱼架上引进鱼进行 1-2 周的病征观察，若出现明显病征，则需要立即对鱼采取隔离，体表消毒及体外受精等操作，防止病原传播及保护品系安全；若未观察到明显病征则可将鱼放入主养殖系统中进行饲养。建议有条件的实验室可以保持引进鱼终身不可进入主养殖系统，只有其后代胚胎经过消毒后方可放入主养殖系统饲养[8]。

3、隔离鱼房的养殖循环系统或者单独的隔离鱼架应为独立循环系统，不应与主养殖循环系统水混用[8]。

4、外部鱼房在鱼缸配种缸鱼捞等工具上也严格与主养殖系统分开使用。所有使用过的鱼缸鱼捞等工具都应进行消毒处理（消毒流程见下图 4.10），未经消毒的外部鱼房鱼捞鱼缸等严禁进入主鱼房使用[8]。

外部隔离鱼架/房—隔离措施

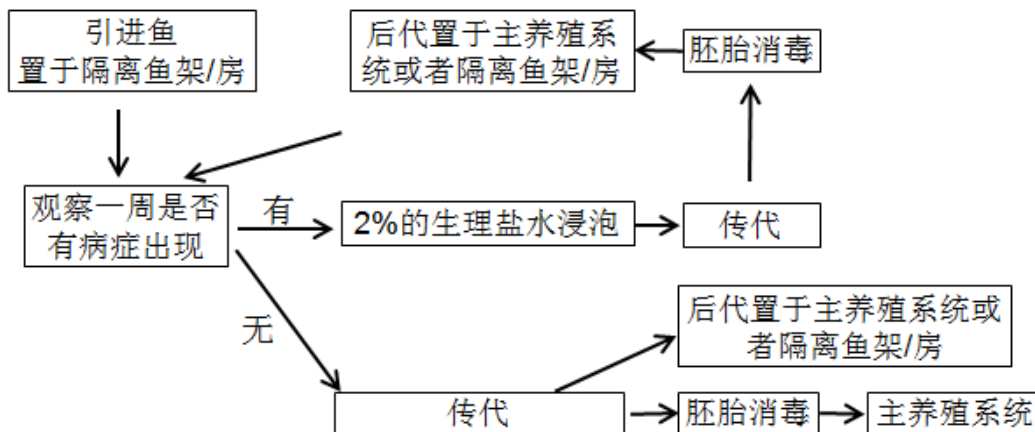


图4.10 外部鱼房隔离措施流程图

## 二、主鱼房斑马鱼健康状况监测

### 1、哨兵岗监测系统

养殖系统中应设有哨兵岗监测系统，固定时间内（每月/每三月/每半年）通过对哨兵岗斑马鱼的健康状况进行监测以评估整个鱼房斑马鱼健康状况（图 4.11）。每个系统的斑马鱼哨兵岗鱼应根据系统过滤后养殖水（post-）和系统未过滤养殖水(pre-)的不同而被分别放置于循环养殖系统的不同位置，命名为系统水哨兵鱼（post-sentinel fish）和尾水哨兵鱼（pre-sentinel fish）。哨兵缸中放置 4-12 个月大的野生型外观正常的斑马鱼，固定时间内随机捞取 5-10 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测。注：哨兵缸内斑马鱼应定期补充[8]。

### 2、其他缸内斑马鱼监测

a、定期从每个系统非哨兵岗鱼缸中随机捞取 5 尾鱼，用于细菌、寄生虫等病原的检测。

b、选取具有典型病症的斑马鱼进行细菌、寄生虫等病原的检测。

### 主养殖系统—哨兵鱼监测系统

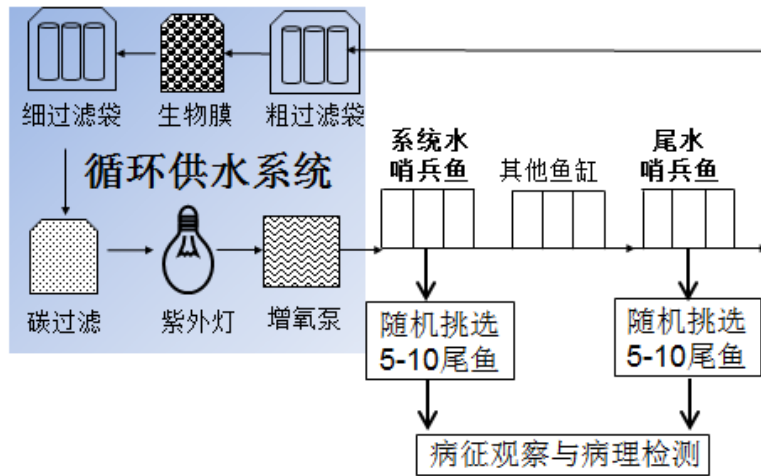
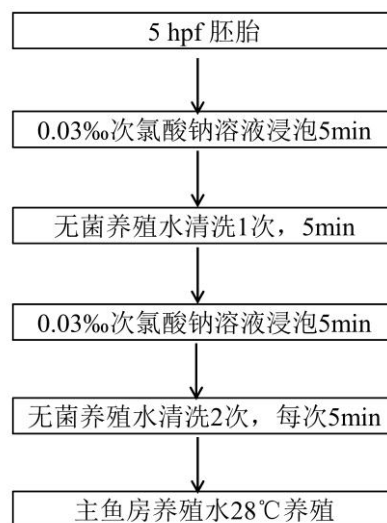


图 4.11 哨兵岗鱼监测系统布局图

### 三、胚胎消毒方法

所有进入主养殖系统的斑马鱼后代胚胎均应进行消毒。常用胚胎消毒方法参照《The zebrafish book》(5<sup>th</sup> edition)方法执行[15]，具体操作为：挑选受精>5 hpf后胚胎，置于含氯量为0.03‰的次氯酸钠溶液中浸泡5 min，取出置于无菌养殖水中清洗1次 5 min，再次取出后再次浸泡于新的含氯量为0.03‰的次氯酸钠溶液中5 min，无菌养殖水中清洗2次，每次5 min即可（图 4.12）。注：整个浸泡消毒及清洗过程，需要不断翻动胚胎，使得胚胎各面充分接触溶液。



4.12 斑马鱼胚胎消毒流程图

#### 四、品系鱼日常传代维护管理

- 1、及时捞出死鱼，隔离病鱼；针对 18 个月以上的老鱼及时安乐死。
- 2、针对需要传代的品系，尽量使用侧交方法进行传代，避免自交传代，以免后代出现不良性状或者生物多样性降低。建议：有条件的实验室可以将用于不同品系传代的野生鱼斑马鱼分开饲养，以免不同病原在品系之间交叉传播[16]。
- 3、针对野生型品系自身传代要尽量保持基因异质性及多态性，避免近交系数随繁殖代数增加而过快上升。作为繁殖用的野生型原种必须遗传背景明确或来源清楚，有较完整的资料（包括来源、种群名称、日期及主要生物学特征等），且引种数目一般不应少于 25 对。

#### 五、鱼房内相关设备维护及日常卫生管理

- 1、养殖设备维护方面操作[8]:
  - a、建立每日巡视制度：巡视鱼房内包括养殖设备在内的各项设施，保证养殖循环设备、纯水系统、紫外灯、空调等正常顺利运行；记录设备上的各项水质参数（包括水温，pH，电导率，溶氧量等）以及室温等，保证各项参数在斑马鱼养殖所需的正常范围。
  - b、建立养殖设备定期监测及维护制度：每月手工监测养殖循环系统的水质参数（包括水温，pH，电导率，溶氧量，氨氮含量等）以防止因系统探头故障出现水质隐患问题；每半年校准设备仪器探头（温度，pH，电导、溶氧探头等）；定期按时更换清洗养殖设备中各项耗材，例如活性炭，过滤棉，紫外灯等（更换频率见表 4.1）；每年安排设备工程师定期检修循环养殖设备。

表 4.1 循环系统各设备耗材更换清洗频率

设备	维护频率
活性炭	每三个月更换一次
粗过滤棉	每周更换清洗一次
细过滤棉	每周更换清洗一次
紫外灯	每日检查，每半年更换一次

## 2、日常卫生管理方面操作[8]:

a、建议执行“一缸一捞”政策，且所有鱼捞使用一次后必须 0.1‰的次氯酸钠浸泡消毒 30min，清水洗净，80℃烘箱烘干 1 h，方可再次使用。

b、所有配种缸，鱼缸等使用过一次后须清水洗净，放于 80℃烘箱烘干 4h，备用。

c、所有鱼缸，鱼缸挡板、盖板都会定期清洗烘干备用。一般情况下，鱼缸每三个月清洗更换一次，鱼缸挡板、盖板每月或者每两周定期清洗更换。

d、鱼房地面每周定期清洗一次；鱼房内台面使用完后 75%的酒精喷洒擦拭干净。

e、安排每日巡视人员须及时捞出鱼房内的死鱼，隔离病鱼；清理掉鱼房各项垃圾，防止细菌和蚊虫滋生，并做好相应详细记录，及时通报。

f、所有进入鱼房的工作人员都必须更换拖鞋或者鞋套入内；工作人员进行相关操作时也必须配戴无粉橡胶手套以防止病原带入鱼房及保护自身安全。

g、建议相关实验室严格控制鱼房进出人员，非相关工作者严禁入内以防止病原带入；若有外来人员入内可采取一次性鞋套等防护措施。

## 六、应对和控制鱼病措施

1、一旦在鱼缸内发现有病征的斑马鱼，及时将其捞出隔离在单独的小缸里（注：小缸非循环系统中鱼缸）。病鱼所在原缸将被清洗消毒处理（清洗消毒流程见五），同时缸内其他未见病征鱼将被捞出，2%的盐水浸泡 20min 或聚维酮碘溶液 25ppm 浸泡 20min，密切观察后续是否会有相应症状出现。对于系统中的其他鱼，可相应采取增大水体电导率（增大养殖循环系统中含盐量）的方法对鱼体表面进行消毒。

2、病鱼将会被送往实验室记录相关病征，并进行病原检测：a、体表粘液、鳃部组织将被取出检查是否有寄生虫；b、腹腔解剖观察是否有腹水及肝糜烂状况，穿刺肝组织涂平板，检测相关细菌感染情况；c、肾脏部位检测是否有分支杆菌的感染；d、脑部组织将被检测是否有微孢子虫的感染；e、肠道组织切片观察毛细线虫及虫卵。

3、在排除抗生素对实验结果造成干扰的前提下，可以加入一定的抗生素进行治疗。例如，寄生虫感染可选取敌百虫，细菌性感染可采用聚维酮碘（建议使用浓度 12.5~50ppm），土霉素（建议使用浓度 0.3g/L）等等。

4、因恶劣的水质会导致鱼体免疫力低下，病原入侵几率增大，所以我们需要密切

关注水质和循环设备运行情况，例如水体 pH，温度，氨氮含量指标是否正常，紫外灯照度是否工作，滤网及活性炭是否及时更换清洗等等。

5、加入硝化细菌，建立适合鱼生存的生物菌落环境，也可预防和控制鱼病。

### 参考文献：

1. Kent, M.L., et al., *Mycobacteriosis in zebrafish (Danio rerio) research facilities*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2004. **138**: p. 383-390.
2. Mason, T., et al., *Strategies to mitigate a Mycobacterium marinum outbreak in a zebrafish research facility*. *Zebrafish*, 2016. **13**: p. S77-S87.
3. Colorni, A., et al., *Detection of mycobacteriosis in fish using the polymerase chain reaction technique*. *Fish Pathol*, 1994. **6**: p. 195-198.
4. Conroy, G. and D. Conroy, *Acid-fast bacterial infection and its control in guppies (Lesbistes reticulatus) reared on an ornamental fish farm in Venezuela*. *Vet. Rec*, 1999. **13**: p. 177-178.
5. Miyazakai, T., S.S. Kubota, and T. Miyashita, *A Histopathological study of Pseudomonas fluorescens infection in tilapia*. *Fish Pathol*, 1984. **19**: p. 161-166.
6. Bowater, R.O., et al., *Deuteromycotic fungi infecting barramundi cod, Cromileptes altivelis (Valenciennes), from Australia*. *J. Fish Dis*, 2003. **26**: p. 681-686.
7. Kent, M.L., et al., *Diseases of zebrafish in research facilities*. Zebrafish International Resource Center.
8. Liu, L.Y., et al., *Zebrafish health conditions in the China Zebrafish Resource Center and 20 major Chinese zebrafish laboratories*. *Zebrafish*, 2016 **13**: p. S8-S18.
9. Petrie-Hanson, L., et al., *Evaluation of zebrafish Danio rerio as a model for enteric septicemia of catfish (ESC)*. *J. Aquat. Animal Health* 2007. **19**: p. 151-158.
10. Plumb, J., *Edwardsiella septicaemias*. In: P.T.K. Woo and D.W. Bruno (eds.). *Fish Diseases and Disorder*, 1999. **3**: p. 479-522.
11. Sanders J. L., et al., *Expansion of the known host range of the microsporidium, Pseudoloma neurophilia* *Zebrafish*, 2016. **13**: p. S102-S106.
12. Kent, M.L. and J.L. Bishop-Stewart, *Transmission and tissue distribution of Pseudoloma neurophilia (Microsporidia) of zebrafish Danio rerio*. *J. Fish Dis*, 2003. **26**: p. 1-4.
13. Whipps C. M. and Kent M. L., *Polymerase chain reaction detection of Pseudoloma neurophilia, a common microsporidian of zebrafish (Danio rerio) reared in research laboratories*. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci*, 2006. **45**: p. 13-16.
14. Kent, M.L., et al., *Pseudocapillaria tomentosa, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (Danio rerio) kept in research colonies*. *Comp Med.*, 2002. **52**(4): p. 354-358.
15. Westerfield, M., *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5rd edition. 2007: University of Oregon Press. 385 pp.
16. Murray, K.N., Z.M. Varga, and M.L. Kent, *Biosecurity and Health Monitoring at the Zebrafish International Resource Center*. *Zebrafish*, 2016. **13**: p. S30-S38.