



实验用斑马鱼养殖地方标准的初步探讨

柯贤福, 胡慧颖, 吴立仁, 施张奎

(浙江省医学科学院 浙江省实验动物管理办公室, 杭州 310013)

【摘要】 斑马鱼因其特有的优势,正越来越广泛的运用于药物筛选、环境保护等领域,但斑马鱼的标准化问题一直未能很好的解决,目前既无国家标准,也没有行业标准,一定程度上限制了斑马鱼作为实验用鱼的广泛应用,也不利于管理部门颁发实验用斑马鱼的行政许可证书。在此背景下,本文从斑马鱼的环境与设施、养殖用水、饲料等方面的标准化问题进行初步探讨,以期促进实验用斑马鱼的浙江省地方标准的形成。

【关键词】 地方标准;斑马鱼,饲养

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0075-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 008. 017

Preliminary study on Zhejiang provincial standard of laboratory zebrafish breeding

KE Xian-fu, HU Hui-ying, WU Li-ren, SHI Zhang-kui

(Zhejiang Administration Office of Laboratory Animal, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Because of its unique advantages, zebrafish has been more and more widely used in drug screening and safety assessment, environmental protection, developmental biology and other fields. But the standardization of environments, feed, and water environment of zebrafish are prominent problems and weakness which hindered their application. This paper probes into the standardization of environment and feed of zebrafish in Zhejiang, in order to promote its standardization construction.

【Key words】 Provincial standardization; Laboratory zebrafish; Breeding

斑马鱼(zebrafish, *Danio rerio*)是国际上在科学研究实验中使用最广泛的鱼类模式生物,具有体积小(可用微孔板分析)、发育周期短、体外受精、透明(可直接用肉眼和解剖显微镜观察)、单次产卵数较高以及实验用药量小,生物结构和生理功能与哺乳动物高度相似等优点。近期研究结果表明斑马鱼与人类基因同源性高达85%以上,其信号传导通路与人类基本近似。斑马鱼的应用日益广泛,我省也有大量的单位开展与斑马鱼相关的研究工作,而与

之相反的是其标准化程度一直不高,一定程度上阻碍了其作为模式生物的应用。本文在简要回顾斑马鱼的主要应用的基础上,就斑马鱼的环境设施、养殖用水及饲料标准进行分析,以期建立实验用斑马鱼的浙江省地方标准。

1 实验用斑马鱼的应用

从1960年开始,斑马鱼就被用于科学研究,现在已经广泛应用于分子生物学、发育生物学、神经

[基金项目] 浙江省科技计划项目(2012C37095, 2014F30020)。

[作者简介] 柯贤福(1980-),男,助理研究员,研究方向:实验动物管理, E-mail: kexfke@163.com。

[通讯作者] 吴立仁(1964-),男,副研究员,研究方向:实验动物管理, E-mail: zjsdgb@163.com。

生物学与遗传学等科学领域。近年来,斑马鱼在发育生物学研究、癌症研究、神经系统生理学研究以及药物研发等领域中也得到了广泛应用,美国国家卫生研究院(NIH)于 2003 年将斑马鱼列为继大鼠、小鼠之后的第三重要的实验动物。

斑马鱼不仅在基础科学研究领域有着广泛应用,在应用研究领域的使用也越来越普遍。欧洲早在 1915 年就开始利用斑马鱼进行环境评估测试的实验,现在欧洲各主要环保机构都以技术标准的形式承认利用斑马鱼进行环境评估和化合物毒性评价的结果。美国环境保护署(Environmental Protection Agency, EPA)已于 2008 年正式接受并认可用斑马鱼进行环境评估和化合物毒性评价结果。在我国,斑马鱼也已成为环境毒理学分析和化合物毒性评价的一个重要模式生物,有 7 个化学品毒性和水质安全检测的相关标准都将斑马鱼列为了推荐使用动物。目前,斑马鱼已经被广泛用于评价化合物的发育毒性、神经毒性、心血管毒性、基因毒性、生殖毒性、致畸性和组织器官毒性等一系列毒性,也是环境毒性分析领域的一个重要模式动物。

斑马鱼在药物研发领域的应用前景非常广阔。自从二十世纪 90 年代进入新药研发领域以来,现已在欧美国家广泛应用于新药筛选、药物毒性与安全性评价。使用斑马鱼模型可以评价药物的发育毒性、心血管毒性、神经毒性、免疫毒性和基因基因毒性等,也可以使用斑马鱼模型筛选癌症、细菌感染、神经退行性疾病、肥胖病和传染性疾病等疾病的治疗药物。2009 年欧洲的一家斑马鱼药物筛选技术服务公司 Biobide 获得了美国食品与药品管理局(FDA)和欧洲药品管理局(EMA)的 GLP 认证,标志着斑马鱼药物筛选与药物安全性评价技术已得到欧美国家政府的正式认可。

斑马鱼作为一种模式生物代表了新药筛选和环境毒理评价发展的方向,国际国内市场前景巨大。近年来,斑马鱼在我省生物医药、环境保护等行业中得到广泛应用,然而,斑马鱼的标准化问题日益凸显,亟待解决。

2 实验用斑马鱼的环境与设施

2.1 环境条件

斑马鱼养殖环境分为水体环境和外部环境。水体环境指斑马鱼养殖水体,外部环境指斑马鱼养殖系统所处的室内环境。斑马鱼养殖的外部环境

标准参照国标《实验动物 环境及设施 GB14925-2010》对于哺乳类实验动物普通环境级别的要求制定,具体技术指标见表 1。因斑马鱼的生活环境为水体,故外部环境的湿度不参考 GB14925,且斑马鱼生活环境的昼夜明暗交替时间宜为 14 h(明)/10 h(暗)。斑马鱼养殖的外部环境指标应符合表 1 所列要求。

表 1 斑马鱼养殖设施外部环境指标
Tab. 1 The external environment indexes of laboratory zebrafish

项目 Indexes	参考值 Reference value
温度 Temperature	26 - 30℃
换气次数 Ventilation rate	≥8 次/h
噪声 Noise	≤60 dB
昼夜明暗交替时间 Ligh and dark time	14 h(明)/10 h(暗)
工作照度 Illumination	≥150 lux

2.2 区域布局

斑马鱼养殖区域包括饲养繁育区和辅助区域及设备。其中斑马鱼饲养繁育区包括鱼过渡室、鱼养殖室、清洁物品贮藏室等;辅助区域主要包括水处理室、仓库、洗刷间、废弃物品存放处理间、机械设备室、准备室、工作人员休息室;设备包括水处理系统、斑马鱼孵化箱、斑马鱼尸体冷藏设备等。

2.3 养殖设备

2.3.1 净水供水设备:净水供水设备用于制备净水和向斑马鱼养殖系统中补充净水。净水供水设备由自来水水桶、水处理单元、净水循环泵、净水水桶和自动控制系统组成。自来水经水处理单元处理后制成反渗透水并收集至净水水桶中,自动控制系统根据净水水桶液位控制净水制备过程。净水水桶中的净水由自动控制系统控制,自动向养殖系统补水。

2.3.2 斑马鱼养殖系统:斑马鱼养殖系统由养殖单元组和水体循环单元组成。养殖单元组由多个养殖单元排列,每个养殖单元分层安装养殖缸,有供水及排水设计;养殖单元框架应使用不锈钢制作并焊接牢固。水体循环单元由水体循环泵、微滤、炭滤、紫外线消毒器、电导率调整、pH 调整、控制箱组成,用于养殖系统水的循环净化。送排水管道应采用无毒、无脱落、不含可塑剂的聚氯乙烯材料,能够拆卸、清洗。

2.3.3 其他养殖设备:养殖缸:食品级聚甲基戊烯材质,可耐受高压蒸汽灭菌,配有可移动式隔板及

上盖。水体采取溢流式循环,可自动清除沉淀残渣。

交配盒:食品级聚甲基戊烯材质,可耐受高压蒸汽灭菌。

鱼网:食品级、不含可塑剂的聚氯乙烯,无脱落,表面光滑。

丰年虾孵化器:宜为亚克力材质,应为食品级。

2.3.4 斑马鱼养殖密度:斑马鱼养殖应保持合适的密度,密度过低,不利于养殖体系的有效利用;密度过高,则会导致不同斑马鱼个体之间因采食竞争激烈,而使个体差异较大,且会引起养殖水体代谢产物浓度过高,最终影响斑马鱼的正常生长发育。此类研究在巨英超、王天奇等学者的报道中均有所体现^[1-5]。建议实验用斑马鱼养殖密度如表 2 所示。

表 2 实验用斑马鱼的养殖密度

Tab. 2 Breeding density of laboratory zebrafish

鱼龄 Age	2.75 L 鱼缸(尾) Volume (tails)	9 L 鱼缸(尾) Volume (tails)
幼鱼(30 d ~ 3 月) Young fish	≤20	≤60
成鱼(3 月以上) Adult fish	8 ~ 14	15 ~ 30

3 实验用斑马鱼的养殖水体

养殖水体是斑马鱼直接接触与生活的环境,故养殖水体的标准化是实验用斑马鱼标准化的重要组成部分。

3.1 水温

合适的温度有利于斑马鱼的正常生长,且能提高食物利用率,增加抗病能力。实验用斑马鱼的适宜水温为(26 ~ 28.5)℃。

3.2 pH 值

斑马鱼在 pH 值低于 5.5 的酸性水环境中生活,易感染鱼类传染病,不利于其正常生存。实验用斑马鱼的养殖水体 pH 值应控制在 6.8 ~ 7.8。

3.3 氨氮(NH₃/NH₄⁺)

氨氮是反映水质情况的重要指标,氨对鱼类具有较强的毒性,斑马鱼的养殖水体总氨应不大于 0.02 mg/L。

3.4 余氯

鱼类对氯非常敏感,氯不仅损害鱼腮,而且可以杀死生物过滤器中的硝化细菌,引起氨和亚硝酸盐升高,易引起鱼类较短时间内死亡。市政用水因为消毒的需要,通常会含氯成分,故斑马鱼的养殖用水需除去其中的余氯。实验用斑马鱼的养殖水体余氯需不大于 0.2 mg/L。

3.5 溶解氧

鱼类生活于水中,用腮进行气体交换,养殖水体中溶解氧含量的多少直接影响斑马鱼的新陈代谢。实验用斑马鱼养殖水体的适宜溶解氧含量为 6 ~ 14 mg/L。

3.6 换水率

既要保证斑马鱼生存的正常环境不被破坏,又要确保水体质量符合微生物等指标的标准,故需要维持一定的换水率。斑马鱼养殖系统的水体每天需更新总水量的 5% ~ 10%。

3.7 电导率

养殖水体的电导率高低跟其内含溶质盐的浓度或其它会分解为电解质的化学杂质有关,是测量水的含盐成分、含离子成分、含杂质成分等等的重要指标。造成电导率的主要离子包括 Cl⁻、Na⁺、SO₄²⁻、Ca²⁺、K⁺等,鱼类对盐分有一定的需求,斑马鱼养殖水体的电导率以 450 ~ 550 μS 为宜。

实验用斑马鱼养殖水体的水质指标要求如表 3 所示。所列数值需在 26℃ ~ 28.5℃ 水温下测得。

表 3 实验用斑马鱼养殖水体的水质指标要求

Tab. 3 Water quality requirements of laboratory zebrafish

项目 Indexes	参考值 Reference value	检测频率 Frequency of testing
水温 Temperature	(26 ~ 28.5)℃	每天 1 次
pH	6.8 ~ 7.8	实时监测
噪声 Noise	≤60dB	每天 1 次
氨(NH ₃ /NH ₄ ⁺)	≤0.02 mg/L	2 次/周
亚硝酸盐 Nitrite	≤0.1 mg/L	1 次/周
硝酸盐 Nitrate	≤50 mg/L	1 次/周
余氯 Cl ⁻	≤0.2 mg/L	2 次/周
溶解氧 Dissolved oxygen	6 ~ 14 mg/L	3 次/周
电导率 Electrical conductivity	450 ~ 550 μS	1 次/周

4 实验用斑马鱼的饲料

4.1 配合饲料质量要求总原则

4.1.1 在配制实验动物配合饲料时,各种原料和添加剂的各项营养指标应采用实测值数据。

4.1.2 营养指标均以 90% 干物质为基础,卫生指标以 88% 干物质为基础。

4.1.3 各项氨基酸、维生素、矿物质及微量元素的指标均为配合饲料中的总含量。

4.1.4 感官指标 配合饲料应混合均匀,新鲜、无杂质、无异味、无霉变、无发酵、无虫蛀及鼠咬。

4.1.5 配合饲料不得掺入抗生素、驱虫剂、促生长剂以及激素等药物及添加剂。

4.2 配合饲料营养成分指标

斑马鱼所用配合饲料的成份包括:鱼制品,麦壳类,酵母,植物蛋白萃取,软体,甲壳类,脂质,藻类,糖类,卵磷脂,EEC 核准色素。

各营养成分组成:蛋白质:48%,脂肪:8%,纤维:2%,灰质:11%,水分:6%

维生素(每 kg): V_A :37600 国际单位, V_{D_3} :2000 国际单位, V_E :125 毫克, V_C :265 毫克。

4.3 活性饵料

4.3.1 丰年虾是斑马鱼养殖的重要活性饵料,丰年虾生存在一定盐度的海水或湖水中,国内的丰年虾卵按来源可以分为渤海湾盐田卵、艾比湖虫卵、西藏卵、朶海卵。

4.3.2 保存温度 0℃ -5℃、干燥避光。

4.3.3 打开包装罐的产品不宜长期使用。

4.3.4 不得与有毒物质同时存放。

4.3.5 丰年虾的孵化:向反渗透水中加入人工海盐和碳酸氢钠,海盐浓度为 15 g/L、碳酸氢钠浓度为 2 g/L;每升水加入 3 g 丰年虾卵;在 28℃、持续光照条件下曝气孵化 24 - 34 h。孵化结束后,收集已孵化的幼虾,清除未孵化的死卵。

4.3.6 丰年虾的喂食量:孵化后的丰年虾用反渗透水清洗干净后使之悬浮于同样的水中,幼虾与水的体积比为 1:9。喂食时每条成鱼喂 0.5 mL 即可。

4.3.7 丰年虾的微生物控制。因丰年虾是斑马鱼的活性饵料,直接存在于斑马鱼的养殖水体,故需对其所携带的微生物进行监测。丰年虾卵来自海洋或盐湖,采集后经清洗并在 -20℃ 冻存 6 个月后方可使用,自身携带微生物有限,但需要排除易引起斑马鱼疾病的迟缓爱德华氏菌、分枝杆菌等病原微生物,具体指标及检测方法它文另述。

5 结语

实验用斑马鱼的标准化研究,是一项复杂的系

统性工作,涉及到斑马鱼的环境设施与设备、养殖水体、饲料、微生物控制、疾病控制等方面,本文仅从其环境及设施、养殖水体、饲料等方面进行初步探讨,还需在后续工作中进一步深入研究。此外,鱼类实验动物的实验动物标准化研究的更为核心的工作在于鱼类疾病的控制和健康状况的维持^[6],吴思昇^[7]、祝梅香^[8]、孙德明等^[9]已从实验用斑马鱼的微生物寄生虫控制、疾病控制、营养需求等方面开展了相关研究,但真正实现标准化,尚有大量的工作需要开展。

参考文献:

- [1] 巨英超,谢英,刘超,等.不同饲养密度对斑马鱼生长发育的影响[J].中国比较医学杂志,2013,23(3):31-33.
- [2] 王天奇,孙荣泽,孙德明.实验用鱼类的水环境及其标准化[J].中国比较医学杂志,2009,19(12):44-51.
- [3] 顾新国.斑马鱼的饲养与繁殖[J].河北渔业,2007,(12):30-31.
- [4] 陈春娜,黄颖颖,陈先均.养殖密度对长薄鳊稚鱼生长的影响[J].当代水产,2011,(6):65-68.
- [5] 陈晓倩,殷浩文.斑马鱼饲养循环装置中的水生环境微生物群落代谢[J].中国比较医学杂志,2007,17(2):110-114.
- [6] 熊静,关瑞章,王艺磊,等.鱼类实验动物研究概况及标准化研究过程面临的主要问题[J].实验动物与比较医学,2012,32(4):366-370.
- [7] 吴思昇,王簪,高昌,等.实验用斑马鱼主要疾病及其实验动物标准化研究过程面临的主要问题[J].实验动物科学,2009,26(4):51-56.
- [8] 祝梅香,王天奇,张长勇,等.实验用斑马鱼剑尾鱼营养需求及饲料现状分析[J].中国比较医学杂志,2009,19(12):61-65.
- [9] 孙德明,穆苑,高昌,等.模型动物斑马鱼及其特定病原净化[J].中国比较医学杂志,2009,19(12):52-60.

[修回日期]2014-06-06

更正

《中国比较医学杂志》2014 年 24 卷第 6 期第 16 页文章《雌激素对小鼠心室肌细胞 ATP 敏感性钾离子通道活性的影响》一文,作者朴伶华的单位“海南大学农学院”更正为“海南医学院基础医学部”,通讯作者柳贤德的单位“海南医学院基础医学部”更正为“海南大学农学院”,特此更正。