**斑马鱼平台鱼房管理条例**

**一、斑马鱼常规养殖条件**

斑马鱼的健康养殖是开展一切斑马鱼有关的研究工作的基础。斑马鱼的实验室饲养过程中，以下的一些环境条件对于斑马鱼的存活、健康、和繁殖传代至关重要。

**温度**

斑马鱼是一种小型热带淡水鱼类，可以耐受比较广的温度。最大耐受的温度范围为6至38℃。一般认为28.5℃是斑马鱼养殖的最适温度，通常情况下鱼房温度控制设置在28℃。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。

**pH值**

水体的pH值对鱼类的生长繁殖具有重要的影响。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值在7.0-8.0左右，这也是大部分淡水鱼类生活的pH范围。斑马鱼相对可耐受一定的碱性环境，酸性环境，尤其pH低于6.0会造成斑马鱼死亡。

**硬度**

水的总硬度指水中Ca2+和Mg2+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100mg/L CaCO3有利于斑马鱼的生长繁殖。但是，这种适应是有限的。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。

**盐度**

斑马鱼属淡水鱼类，但是能够耐受很大的盐度范围。斑马鱼养殖的适宜盐度通常为0.25‰。养殖系统的盐度控制范围为0.25-0.75‰。

**溶解氧**

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6.0mg/L （28.0℃），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。水体内通空气过度，会造成气体达到和超过饱和浓度，产生大量气泡，对鱼造成致命危害，产生气泡病。

**氨氮废物**

养殖水体中的氨主要来源于鱼的腮上皮组织释放和粪便排放。含氮废物的主要来源是水体中的有机物（如死鱼，粪便，漂浮食物）的降解。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。水体中的硝化细菌可以将氨氮废物转化为亚硝酸盐，进而转化为硝酸盐，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。较低浓度的硝酸盐对鱼类基本无害，但是浓度超过200ppm，就可能对斑马鱼的健康造成影响。因此，监控水体内的氨氮水平，和硝酸盐浓度对维持一个健康的养殖水系是很重要的。

**光周期/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。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。

二、**斑马鱼鱼房的管理**

**1、人员管理**

斑马鱼养殖人员及实验操作人员岗前接受培训。培训内容包括：斑马鱼房设施的特点、斑马鱼鱼房管理条例及操作规程等。

**2、合理安排各项消毒的事项**

斑马鱼房常用器具需定期消毒灭菌。捕捞斑马鱼的渔具和收集受精卵的滤网需浸泡在消毒液中，使用前后用清水充分冲洗。使用完毕后放回消毒液中浸泡20min以上，再清水清洗后80℃烘干备用。消毒液需每周更换。玻璃器皿需定期高压灭菌。其它不适于高压灭菌的器皿，应使用消毒液消毒灭菌。斑马鱼房墙面和地面需每周使用消毒液清洗消毒。

斑马鱼房隔离养殖区的任何器具在未经消毒处理前不得带离该区域，鱼捞、鱼缸等用具单独使用。在隔离养殖区收集的受精卵需经过消毒后方可转移至斑马鱼房内部养殖区养殖。

**3、斑马鱼养殖系统的维护及保养**

斑马鱼养殖系统是一种较为复杂、价格昂贵的大型贵重仪器，而且需要连续运转，因此对设备的维护保养至关重要。为了保证斑马鱼养殖系统的正常运行，斑马鱼房管理人员需坚持如下的检查项目：

**3.1**、 每天检查系统运行电压等参数是否符合系统运行的要求。

**3.2**、 检查紫外灯是否正常工作。

**3.3**、 检查系统pH、温度、电导率及溶氧度是否在规定范围内。

**3.4**、 定期清洗各种检测探头。

**3.5**、 每周检测养殖水中的氨氮含量。

**3.6**、 每1-2周更换过滤棉袋及活性炭

**3.7**、 每月检查斑马鱼养殖系统的控制系统及报警系统的各种开关、换能器、电池、表头和保险丝的接触情况和运行情况，确保机组正常运行。

**3.8**、 空调机、排风机要经常保养。

**3.9**、 与斑马鱼养殖系统制造商建立系统年检制度，每年由制造商对系统做系统全面的维护。

**4、斑马鱼房巡视制度**

每天早晚两次由工作人员检查斑马鱼养殖区养殖缸及斑马鱼状态。如发现病死鱼需及时处理，并做记录。

**5、物品及养殖耗材的管理**

斑马鱼鱼房的养殖耗材需统一存放，并建立领用登记制度。同时，为了保证环境的清洁度，应尽量减少人员进出的次数及保证物品的消毒、灭菌。物品进入斑马鱼房之前，必需经消毒灭菌处理。

三、**斑马鱼的饲养和传代**

**1、斑马鱼的饲养**

**1.1、 成鱼的饲养**

每天喂食两次，在**9:00**和**15:00**这两个时间段。2个半月后的成鱼建议开始分缸（中缸内可放10~20条斑马鱼。数量上请勿过少容易造成雌鱼肚子变大不产卵的情况，也勿过多容易造成成鱼体型过小的情况）。

**1.2、性别的选择**

在斑马鱼养殖初期的2个月内，若加大饲喂量则会造成同一批次内雌鱼数目增多，反之则雄鱼增多。若增大饲养密度则会造成同一批次内雄鱼数目增多，反之则雌鱼增多。请大家按照自己的需求自行调节（主要是饲喂量及养殖密度）。

**1.3、小鱼的饲养**

 **0~5**天 受精卵被收集之后，5天之内的胚胎可在培养皿内静水培养。可以使用普通养鱼水或者胚胎培养基，置于28.5℃恒温温箱内，每天换水，培养密度不宜超过每个培养皿（90mm）60个胚胎。斑马鱼胚胎在5天之内不需喂食。

**5~15**天 转移到大的培养器皿中继续静水培养，1L体积内不宜放置超过100尾幼苗。每天需要更换至少50%体积的水。可在培养用水或溶液中加入1/10000体积的亚甲基蓝，抑制霉菌生长。斑马鱼的幼苗在出生后第5天开口进食，在此阶段及时提供食物可以促进斑马鱼幼苗的成活率。斑马鱼幼苗常见的食物是新鲜孵化的草履虫（paramecia）。每天喂食2-3次。

1**5~30**天 可以开始使用滴水法的近似静水培养，不需继续换水。如果条件不具备，需要继续静水喂养，则需要使用更大体积的养殖水（用中缸进行养殖，水不可高过5cm），1L体积内不宜放置超过30尾幼苗。15天以上的斑马鱼可以开始喂食丰年虾（artemia，又称丰年虫，卤虫）的幼虫，一天喂食2-3次。其中12天至15天的幼苗，可以采用草履虫和丰年虾混合喂养的方式，让幼苗适应新食物。

**30天以上** 可以开始正常上架，进入水循环系统。做好标记为幼鱼，插上细网隔板，以免水流太大将鱼冲走。一天应喂食2-3次丰年虾的幼虫，也可搭配喂食固体颗粒饲料。正常喂养的情况下，3个月大的斑马鱼即可性成熟，交配产生下一代。

**1.4、外来鱼**

 外来成鱼可替换去一半的水，换至贴有特殊颜色标签的交配盒内，在鱼房内静置1到2天后，若一切正常则放入隔离小系统内。

 外来小鱼换水倒入贴有特殊颜色标签的交配盒内，对照小鱼饲养方式喂养。保险起见，外来小鱼建议喂养到1个月后再放入隔离小系统内饲养。

另外，外来的鱼拿至鱼房前，需提前告知平台工作人员并进行安排后再进入鱼房！

**1.5、标签使用及登记**

 任何品系的斑马鱼放入系统内都请先与平台工作人员联系，查看所放位置是否合适。

 标签书写有相关格式，重要信息（品系名称，传代人，传代时间）勿遗漏，请使用马克笔书写。

品系标签格式如下：

纯杂及代数信息

品系名称

传代人 传代时间

 标签请找平台工作人员拿取，使用完后请归还并附上放入品系的标签信息及位置，配合鱼房品系登记工作

**1.6**、**死鱼、病鱼、老鱼及无用鱼的清理**

及时清理养殖缸内的死鱼和外形不正常的病鱼，防止水质污染和病菌传染。

每个季度，请品系负责人按照实验用鱼的处死和尸体处理方法将不再使用的老鱼和无用的鱼（征得平台负责人同意后）及时清理，并告知平台管理人变更情况。

**2、斑马鱼的配鱼和鱼卵收集**

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。这时候雌雄鱼相遇则有可能交配产卵。健康的斑马鱼性成熟后即可开始交配产卵，6个月到18个月大的斑马鱼是生产的高峰期，一对健康的斑马鱼一次交配可产受精卵200枚以上。

**2.1、交配准备**

配鱼时间应在需要收集鱼卵的前一天傍晚。使用配鱼专用缸，把内缸（底部有漏网）套入外缸之内，加入约2/3缸水，用隔板把雌雄鱼分开。每缸按照雌雄鱼1:1或者2:1的比例放置鱼。密度不宜过高。（由于鱼房灯光自动调节，故晚上10点之后不建议留在鱼房继续工作）

**2.2、配鱼和收卵**

第二天早晨，光周期开始后，可按需要的时间把隔板抽开，让雌雄鱼交配产卵。一般相互接触后雄鱼会追逐雌鱼，15分钟之后雌雄鱼开始交配产卵。所产受精卵会从内缸底部漏下，进入外缸，避免成鱼接触和吃掉受精卵。每次收集受精卵都可直接将内缸拿出，换入另外一个外缸，把原缸内的受精卵随手倒入收集网内，用水冲洗到培养皿内。（由于饲养员喂鱼比较早，建议在下午2点半前收卵完毕，若有特殊情况来不及收，可以先让饲养员留点丰年虫卵，等你放鱼的时候自己喂）。每次使用完后将交配盒和隔板清洗干净，摆放回架子上。

如果收集受精卵是为进行显微注射实验，则可通过设定抽开隔板时间，控制雌雄鱼接触的方法控制受精卵的年龄，保证收集到同一时期的受精卵。但是光周期开始2小时后，雌鱼如果未能接触到雄鱼，则开始消化体内未排出的卵，鱼卵质量开始下降。所以受精卵收集工作应尽量在光周期开始后2小时内进行。

**2.3、交配时间登记**

 交配时间记录鱼缸的专用标签纸上面，如果该缸鱼鱼缸上没有交配时间标签纸，可来找平台工作人员询问并补充。

**2.4、注意事项**

在使用野生型斑马鱼的过程中若发现缸中鱼数目有出入，请在订鱼本子上标明，平台工作人员会及时补充和查找问题。 若发生转基因鱼和野生型鱼混淆的情况，请及时提出，避免影响到他人实验，并由转基因鱼的相关负责人完成筛选工作。

**说明：**

养鱼水：以约0.06g海盐加入1L的蒸馏水中（终浓度约60μg/ml），充分溶解即可。

草履虫培养：将小麦粒干热灭菌后，加水煮15分钟，分装在无菌容器内，4℃保存备用。在每1L净水中加入1g酵母粉，1ml全脂牛奶，1gNaCl，混入约15粒煮熟的麦粒，接入2ml草履虫种源，静置培养5-7天左右可用。

丰年虫培养：在12L水中，加入约300g海盐，1勺NaHCO3（6-10g），50g丰年虫卵，通气培养24小时可用。

**四、斑马鱼的安乐死**

使用后妥善处理实验动物，是实验动物伦理学的要求。在处理实验动物的过程中，应该秉着尽量温和，减少动物痛苦的方法。

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钟：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（第一章第六节附录）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。

**五、斑马鱼平台工作人员注意事项**

1.相关记录： 平台工作人员须每天早、晚各查看一遍系统，及时记录循环系统面板数值及水温变化。实时了解斑马鱼产卵情况、草履虫繁殖情况及丰年虾孵化情况，并及时更新统计表中斑马鱼的品系、数量和出生日期等信息。

2. 整理鱼架： 平台工作人员须及时关注鱼架上每缸鱼的生长状况，并且根据鱼的生长情况及时调节鱼的密度、鱼缸大小和鱼缸的清洁等。在整理鱼架过程中，如需改变鱼缸位置，须做好登记。

3. 斑马鱼的传代： 平台工作人员须时刻关心平台内各斑马鱼的传代情况，及时对不同品系斑马鱼进行传代培养。

4. 耗材更换 经常检查鱼房耗材使用情况，掌握基本的更新频率（主要有：大系统滤袋1-2周一次；小系统滤袋2-4周一次；滤膜1-2周一次；循环系统紫外线灯管一年一次；纯水系统滤膜及微滤芯一年一次；全热空气交换器滤膜及微滤芯一年一次）

5. 流水通畅： 须每天检查管子是否流水及流速是否合适，如不流水，则须把小水闸拧下，检查内部是否有活性炭等脏物存积。如已损坏，则需更换新的水闸。如发现鱼缸内积水与盖齐高，则需检查插板与缸子后部缝隙间是否积有沉积物，及时清除以保证流水通畅。

6. 开放时间： 周末和节假日不对外开放。