



卜纪雯, 西南大学分子发育生物学硕士。2008年进入中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所(现变更为中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心)工作, 2014年被评为高级实验师。2005年至今一直从事斑马鱼相关研究和管理工作。工作期间以第二作者在 *Circulation Research*、*Angewandte Chemie International Edition* 等杂志发表合作论文共8篇。主要擅长的技术有斑马鱼胚胎显微注射、转基因斑马鱼制备、CRISPER/Cas9基因敲除/敲入技术、斑马鱼胚胎移植、斑马鱼胚胎原位杂交、活体斑马鱼长时程共聚焦成像等。在长期的斑马鱼管理工作中, 积累了丰富的管理经验, 主持开发了《斑马鱼房及品系自动化管理系统 V1.0》软件, 于2021年获得计算机软件著作权。

一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案

金仕容¹, 华叶¹, 訾化星², 杜旭飞¹, 卜纪雯²

[1. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 全脑介观神经联接图谱研究平台(斑马鱼), 上海 200031; 2. 中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心(原中国科学院上海生命科学院神经科学研究所), 感觉整合与行为研究组, 上海 200031]

[摘要] **目的** 解决实验用斑马鱼出现的生长发育滞后、产卵量不足等问题, 以提高实验用斑马鱼的繁殖效率和使用寿命。**方法** 取受精后2月龄的斑马鱼, 以投喂商品化的观赏鱼专用颗粒饲料或冰冻成体卤虫为实验组, 以投喂活的幼体卤虫为对照组。不同饵料投喂70 d内, 通过测量体长和体重评估斑马鱼生长性能, 通过统计产卵量和产卵率等评估斑马鱼繁殖性能。对甲状腺肿大病症明显的斑马鱼投喂颗粒饲料, 通过测量其甲状腺肿大病灶直径大小变化评估颗粒饲料对该病症的抑制效果。将3种饲料配合使用, 对饲养方案进行优化, 通过繁殖性能测试验证其用于斑马鱼饲养的实际效果。**结果** 从60 dpf开始投喂颗粒饲料直到111 dpf, 颗粒饲料组的体长、体重均日渐优于对照组 ($P<0.0001$)。从60 dpf开始投喂成体卤虫直到96 dpf, 成体卤虫组的体长增长趋势与对照组基本相同, 而75~82 dpf时成体卤虫组的雌鱼体重极明显高于对照组的雌鱼 ($P<0.0001$)。成体卤虫组斑马鱼相比于对照组, 雌雄间体色差异显著, 在75 dpf时, 已可以通过体色差异准确区分性别; 而且成体卤虫组斑马鱼3月龄时产卵率显著高于对照组 (94.44% vs 27.78%, $P<0.05$)。另外, 投喂颗粒饲料130 d后, 所有实验用斑马鱼的甲状腺肿大病灶均消失。根据以上结果, 将3种饲料组合, 优化大于2月龄的斑马鱼饲养方案为上午保持喂食幼体卤虫, 下午用颗粒饲料和成体卤虫交替投喂, 直至12月龄斑马鱼的产卵率可以保持70%, 产卵量达到 (233.6±3.95) 颗, 受精率和孵化率分别为97.47%和90.24%, 均显著高于原方案饲养组 ($P<0.001$ 或 $P=0.01$)。**结论** 相比幼体卤虫饵料, 商品化的颗粒饲料能显著提升斑马鱼的生长性能, 并对甲状腺肿大病症有治疗作用, 而成体卤虫饵料能显著提高斑马鱼的早期繁殖性能。优化后的饲养方案成功提高了斑马鱼的产卵效率, 并延长其繁殖使用寿命, 能更好地保障相关科学研究的开展。

[关键词] 斑马鱼; 饲养方案; 繁殖性能; 生长性能

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0297-10



An Optimized Experimental Zebrafish Breeding Scheme for Significantly Enhancing Reproductive Efficiency and Service Life

JIN Shirong¹, HUA Ye¹, ZI Huaxing², DU Xufei¹, BU Jiwen²

[1. Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience), Chinese

[基金项目] 国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”重点专项项目“斑马鱼发育与代谢突变体库的系统创制”(2018YFA0801000)

[第一作者] 金仕容(1994—),女,硕士,实验师,研究方向:水产养殖。E-mail:18817772747@163.com;

华叶(1983—),女,硕士,助理研究员,研究方向:斑马鱼早胚发育与精子发生。E-mail:ye.hua@ion.ac.cn

[通信作者] 卜纪雯(1982—),女,硕士,高级实验师,研究方向:分子发育生物学。E-mail:jwbu@ion.ac.cn。ORCID:0009-0006-0933-7314

Academy of Sciences, Research Platform of Whole Brain Mesoscopic Neural Junction Map (Zebrafish), Shanghai 200031, China; 2. Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience), Chinese Academy of Sciences, Lab of Sensory Integration & Behavior, Shanghai 200031, China]

Correspondence to: BU Jiwen (ORCID: 0009-0006-0933-7314), E-mail: jwbu@ion.ac.cn

[ABSTRACT] Objective To solve the problems of delayed growth and development and insufficient spawning of experimental Zebrafish, so as to improve the reproductive efficiency and service life of experimental Zebrafish. **Methods** The zebrafish at the age of 2 months after fertilization were divided into two groups. The experimental group was fed with dry commercial diets specifically designed for ornamental fish or frozen adult brine shrimp, while control group was fed with live laval brine shrimp. Within a period of 70 days, the growth performance of the zebrafish was evaluated by measuring body length and weight, and the reproductive performance was assessed by measuring the fecundity and spawning rate. Zebrafish with apparent goiter disease were fed with dry commercial diets, and the inhibitory effect of the pellets on this disease was evaluated by measuring the diameter of the thyroid enlargement lesion. The three feeding methods were combined, and the feeding plan was optimized. The actual effects of the plan on zebrafish rearing were validated through reproductive performance tests. **Results** Starting from 60 days post-fertilization (dpf) until 111 dpf, the body length and weight of the dry commercial diets feed group gradually surpassed those of control group (all $P < 0.0001$). From 60 dpf to 96 dpf, the growth trend in body length of the adult brine shrimp group was similar to that of control group, but the female fish in the adult brine shrimp group had significantly higher body weight than the female fish in control group at 75-82 dpf ($P < 0.0001$). Compared to control group, there was a significant difference in body color between males and females in the adult brine shrimp group, and at 75 dpf, gender could be accurately distinguished by body color differences. Furthermore, the spawning rate of the zebrafish in the adult brine shrimp group at 3 months of age was significantly higher than that of control group (94.44% vs. 27.78%, $P < 0.05$). Additionally, after feeding with the dry commercial diets for 130 days, all thyroid enlargement lesions in the experimental zebrafish disappeared. Based on the above results, the three feeding methods were combined and the feeding plan for zebrafish older than 2 months of age was optimized as follows: feed live brine shrimp in the morning, and alternate between dry commercial diets and adult brine shrimp in the afternoon. This feeding plan lasts until the age of 12 months. The spawning rate of Zebrafish can maintain 70%, and the spawning amount can reach (233.6 ± 3.95) eggs. The fertilization rate and hatching rate were 97.47% and 90.24%, respectively, both significantly higher than those of control group ($P < 0.001$, or $P = 0.01$). **Conclusion** Compared to live brine shrimp feed, the dry commercial diets feed significantly improves the growth performance of zebrafish and has a therapeutic effect on thyroid enlargement disease. On the other hand, adult brine shrimp feed significantly enhances the early reproductive performance of zebrafish. The optimized feeding plan successfully improves the spawning efficiency of laboratory zebrafish, prolonging their reproductive lifespan and better supporting relevant scientific research.

[Key words] Zebrafish; Breeding scheme; Reproduction; Growth

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是生命科学研究中常用的模式脊椎动物, 它具有体型小、繁殖力强、可体外受精和体外发育、胚胎全身透明等众多优点。目前, 国内外以斑马鱼为主要研究对象的实验室日益增多^[1], 同时斑马鱼养殖标准化的问题也日益凸显。在2020年实施的GB/T 39649—2020《实验动物 实验鱼质量控制》中, 仅注明5~15 dpf (day post fertilization, 受精后日

龄) 斑马鱼适宜投喂草履虫, 未给出适宜投喂 ≥ 16 dpf 斑马鱼的生物饵料方案^[2]。业内交流中发现, 大部分斑马鱼实验室采用卤虫 (也称盐水丰年虾, brine shrimp) 休眠卵孵化的无节幼体卤虫作为单一食物来源, 和剑尾鱼、诸氏鲮虾虎鱼养殖方案一致, 其优点是养殖操作简便, 盐水孵化18~30 h便可获得^[3], 但也存在营养来源不足的缺陷。

适宜的饵料对鱼类的健康及繁殖能力至关重要^[4-5]。自然条件下,斑马鱼食谱广泛,包括蠕虫、昆虫幼虫和各种底栖及浮游甲壳动物^[6]。但是在实验室养殖过程中,由于食物来源单一,斑马鱼常出现个体消瘦、生长发育滞后、体色变浅、雌雄性征不明显、免疫力下降、繁殖力下降等一系列问题。除此之外,实验室养殖的斑马鱼还具有以下特点:(1)品系较多,包括各种特殊遗传学模型(如一些基因敲入、基因敲除、ENU诱变的模型等)或转基因动物;(2)繁殖频次高,为满足科研需求,往往雌鱼7 d一个交配周期,雄鱼则多为3 d一个交配周期;(3)为保障较高的遗传均一性,转基因品系和突变品系往往以近交方式进行繁殖^[7],进而导致不良突变的累积,容易造成发育缺陷。以上特点决定了实验室条件下斑马鱼对营养物质的需求更高。因此,在实验室条件下养殖斑马鱼,需要更加注重食物的选择和搭配,以弥补实验室养殖条件下的诸多不足。

对鱼类而言,天然饵料一般更有吸引力且更易于消化^[8],但可能存在营养物质不足的风险,例如卤虫常缺乏某些脂肪酸或维生素C^[9]。为此,商品化的配合饲料应运而生,其按鱼体所需营养水平,将不同能量饲料、蛋白质饲料及矿物质、维生素、微量元素通过科学配比混合,采用相应的工艺配制而成^[10]。目前,商品化的斑马鱼专用饲料研发进展缓慢^[11];而观赏鱼配合颗粒饲料的研究进展迅速,且商品化技术成熟^[12-13]。已有的商品化的观赏鱼饲料是否可以满足斑马鱼的需求,尚且未知。本研究选取两类商品化饲料和冰冻成体卤虫对实验用斑马鱼进行投喂,比较不同饵料对斑马鱼生长和繁殖指标的影响,旨在对实验室条件下的斑马鱼饲养方案进行优化,以提高实验用斑马鱼的繁殖性能,并延长其使用寿命,从而保障科学研究的效率。

1 材料与方法

1.1 实验用动物

选择体长及体重适中、规格一致、亲本相同的2月龄(即60 dpf)斑马鱼 *mitfa*^{w2/w2} (AB),之前均采用传统投喂方式,饲料为幼体卤虫。本研究在中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心杜久林研究组斑马鱼房进行,该单位前身为国家斑马鱼中心,目前改迁至武汉斑马鱼中心,是国内最早一批以斑马鱼为模式生物的实验室,已经有十几年的养殖历史,一直稳定

养殖本实验中使用的野生型斑马鱼品系。本研究方案经中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心动物管理委员会动物福利伦理审核小组审批通过(伦理批号:NA-046-2019)。

1.2 实验材料

活幼体卤虫(0.4~0.5 mm)由休眠的皇冠西藏大红卵孵化(水温30℃,盐度10‰,孵化时间23 h)获得。两类商品化饵料为观赏鱼专用颗粒饲料——莫斯特主食M号(0.5~0.8 mm)和日清丸红B2号(0.36~0.62 mm),以及冰冻成体卤虫为神阳多维冰冻丰年虾(50~80 mm),由鲜活的卤虫成体经过营养富集后急速冰冻而成。

1.3 实验分组

实验分2组进行:实验组1投喂商品化的颗粒饲料,实验组2投喂成体卤虫(冻);2组的对照均投喂幼体卤虫(活)。每组设3个缸,每缸(3 L)饲养斑马鱼20尾。每天于9:00、15:00各投喂一次。投喂量以斑马鱼5~10 min 呵食完且胃部呈饱满状态为准,并根据斑马鱼的生长情况及时调整。

1.4 饵料营养成分检测

委托英格尔检测技术服务(上海)有限公司对颗粒饲料1(莫斯特牌)、颗粒饲料2(日清牌)、成体卤虫、幼体卤虫进行营养成分的检测,包括钙、磷、镁、铁、硒、锌、泛酸(维生素B3)、抗坏血酸(维生素C)和维生素B2。

1.5 生长性能指标测定

生长性能指标为体长(cm)、体重(g)。分别于60 dpf(初始时间)、75 dpf、82 dpf、89 dpf、96 dpf/111 dpf 采样测量斑马鱼的体长、体重,即每组随机捞取斑马鱼9尾(3尾缸),禁食24 h后,MS-222(0.1 g/L, Sigma-Aldrich E10521)麻醉,厨房用纸吸干鱼体表面水分,用直尺测量体长,然后用电子秤(Mettler PL202-S,精度为0.01 g)测量体重。

1.6 繁殖性能指标测定

繁殖性能指标为体色、产卵率、产卵量、受精率和孵化率。90 dpf时,进行体色观察,并且每组随机抽取1条斑马鱼,用iphone 11相机直接近距离拍摄。

选取颗粒饲料组或成体卤虫组雌鱼与幼体卤虫对照组雄鱼,按照雌雄比例1:2进行配对繁殖实验。将雌雄配对的亲鱼放入专用交配缸中,用隔板隔开雌雄鱼过夜后,于次日早上取出隔板,让雌雄鱼相互追逐

并产卵繁殖。1 h后将雌雄亲鱼移出，收集鱼卵至培养皿中，用 Visual Counter 软件对鱼卵进行计数，并将培养皿置于培养箱中孵化 [上海一恒科学仪器有限公司光照培养箱 MGC-350BP-2, (28±0.5) °C, 明暗交替 14 h: 10 h]。后续及时吸出未受精卵，并计数受精卵数。将孵化出膜的仔鱼移入另一培养皿中，记录初孵仔鱼数。并按以下公式计算亲鱼繁殖性能指标：产卵率 (%) = 产卵缸数/配鱼缸数×100；产卵量 (颗) = 每缸实际产卵数量；受精率 (%) = 受精卵数/产卵量×100；孵化率 (%) = 初孵仔鱼数/受精卵数×100。

1.7 甲状腺肿大病症治疗效果测定

实验室斑马鱼在养殖过程中甲状腺肿大病症频发，肉眼可以很明显地观察到甲状腺肿大。而预实验发现，颗粒饲料对甲状腺肿大病症起到了显著的抑制作用。因此，本实验随机选取一批甲状腺肿大症状明显的病鱼作为实验对象 ($n=15$)，每天于 9:00、15:00 投喂颗粒饲料。实验开始第 0、30、130 d, MS-222 (0.1 g/L) 麻醉病鱼，厨房用纸吸干鱼体表面水分后，用直尺测量甲状腺肿大病灶直径 (cm)。

1.8 优化饲养方案后的斑马鱼生长及繁殖性能测定

结合实验结果，将 3 种饲料配合使用，对饲养方案进行优化后，通过 1.6 节繁殖性能测试验证其用于饲养斑马鱼的实际效果。以原饲养方案 [在仔鱼期 (12 dpf 前) 投喂海水轮虫，此后仅投喂幼体卤虫 (活) 作为唯一食物来源] 为对照。

1.9 统计

应用 SPSS 13.0 软件对各实验数据进行统计分析，图表中的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异用两因素方差

分析，组内两两比较用 LSD-*t* 检验，并进行显著性检验，设显著性水平为 0.05，极显著水平为 0.01。

2 结果

2.1 不同饵料营养成分对比

由于目前有关斑马鱼对矿物质、维生素等营养需求的研究较少^[5]，因此表 1 中列举的部分指标是将鲤鱼的需求量作为斑马鱼 (同为鲤科) 需求量的参考。由表 1 可知，幼体卤虫所含营养成分最低，钙、铁、维生素 B3、维生素 B2 均未检测出，该食物仅满足斑马鱼对硒和锌的营养需求。颗粒饲料 2 (日清牌) 的营养成分最全面，除维生素 B3 未检测出以外，其余成分的含量均超出斑马鱼成长需求，且相较于颗粒饲料 1 (莫斯特牌) 而言，其营养价值更高。值得关注的是，在 4 种饵料中，仅成体卤虫含有丰富的维生素 B3，且满足斑马鱼生长需求。

因此，在后续实验中，以颗粒饲料 2 为实验对象，成体卤虫为天然饵料对象，开展斑马鱼生长及繁殖性能的测试。

2.2 不同饵料对斑马鱼生长性能的影响

2.2.1 颗粒饲料组

由图 2 可知，各实验组斑马鱼的初始体重一致，而整个实验期内，体长、体重均呈现增加趋势。实验期 1~22 d 内，颗粒饲料组 (日清牌) 斑马鱼的体长和体重增长量高于幼体卤虫组 (对照组)，但是差异没有统计学意义 ($P>0.05$, 图 1A~B)。随后，颗粒饲料组斑马鱼的体长和体重持续快速增长，89 dpf 时其体长及体重均极显著高于幼体卤虫组 ($P<0.001$, $P<0.01$) (图 1A~B)。直至实验结束，颗粒饲料组斑马鱼在体长和体重指标上始终极显著高于

表 1 不同饵料营养成分表

Table 1 Nutrition ingredients of different diets

营养成分 Nutrition ingredients	需求量 Requirement	幼体卤虫(活) Larva brine shrimp (live)	成体卤虫(冻) Adult brime shrimp (frozen)	颗粒饲料 1 Dry commercial diets-1	颗粒饲料 2 Dry commercial diets-2
钙 Calcium/%	0.9 ~ 1.6 (斑马鱼) ^[5]	未检出	未检出	2.31	2.62
磷 Phosphorus/%	0.8 ~ 1.4 (斑马鱼) ^[5]	0.12	0.07	1.92	2.22
镁 Magnesium/(mg·kg ⁻¹)	600 mg/kg (鲤鱼) ^[14]	186	102	6 110	5 360
铁 Iron/(mg·kg ⁻¹)	150 mg/kg (鲤鱼) ^[15]	未检出	58.5	575	940
硒 Selenium/(mg·kg ⁻¹)	0.12 mg/kg (鲤鱼) ^[16]	0.15	0.27	3.22	4.55
锌 Zinc/(mg·kg ⁻¹)	15 ~ 30 mg/kg (鲤鱼) ^[15]	20	5.3	160	300
维生素 B3 Vitamin B3/(mg·kg ⁻¹)	30 ~ 40 mg/kg (鲤鱼) ^[17]	未检出	133	未检出	未检出
维生素 C Vitamin C/(mg·kg ⁻¹)	30 ~ 50 mg/kg (鲤鱼) ^[17]	50.5	102	1 000	3 960
维生素 B2 Vitamin B2/(mg·kg ⁻¹)	7 ~ 10 mg/kg (鲤鱼) ^[17]	未检出	未检出	38	84.8

幼体卤虫组 ($P<0.0001$, 图 1A~B)。结果显示, 商品化的颗粒饲料显著提升了斑马鱼的生长性能。

2.2.2 成体卤虫组

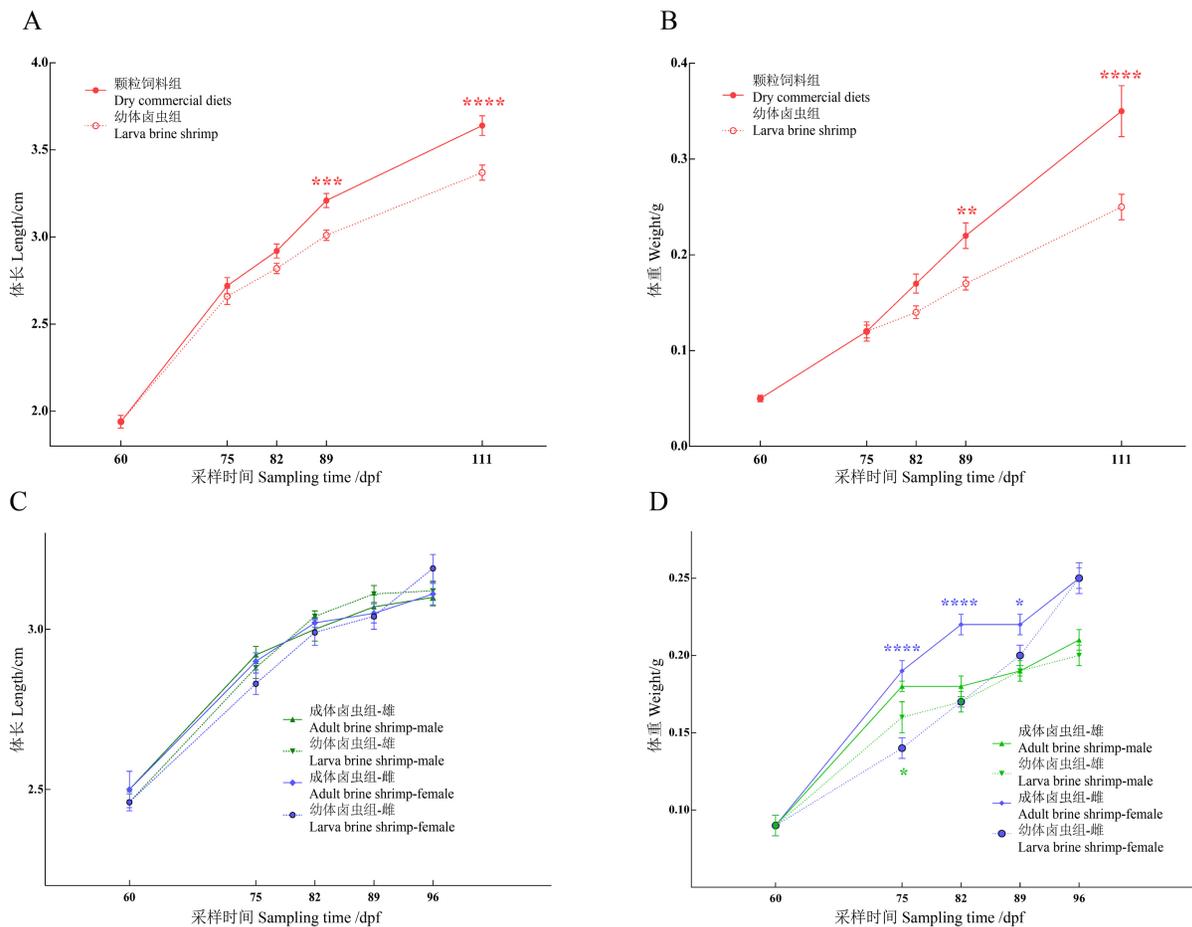
投喂至 75 dpf 时, 成体卤虫组可根据体色和体型明显区分出雌雄性别, 按照雌雄分组后分别进行体长及体重的测量。由图 1C 可知, 成体卤虫组斑马鱼的体长增长趋势和幼体卤虫组基本相同, 雌雄分别对比幼体卤虫组时均未见明显差异 ($P>0.05$)。而从增重效果来看, 幼体卤虫组雌鱼增重先慢后快, 而成体卤虫组先快后慢, 其中成体卤虫组体重在 72、82 dpf 极显著高于幼体卤虫组 ($P<0.0001$), 随后雌性鱼体重增长放缓, 在 89 dpf 显著高于幼体卤虫组 ($P<0.05$), 直

至 96 dpf, 幼体卤虫组雌鱼和成体卤虫组雌鱼的体重差异缩小 (图 1D)。相较于雌鱼而言, 两个处理组间雄鱼体重增长趋势基本相同, 仅 75 dpf 时成体卤虫组雄鱼体重显著高于幼体卤虫组 ($P<0.05$, 图 1D)。因此, 成体卤虫可显著提高斑马鱼雌鱼早期的体重生长性能。

2.3 不同饵料对斑马鱼繁殖性能的影响

2.3.1 雌雄体色差异

投喂成体卤虫组斑马鱼相较于幼体卤虫组, 体色鲜艳, 呈金黄色, 雌雄间体色差异显著; 在 75 dpf 时, 已可以通过体色差异, 准确区分性别 (图 2A)。相较于幼体卤虫组, 颗粒饲料组的体色发白, 且雌雄个体



注: 每组 9 条斑马鱼, 数据均以平均值 \pm 标准差表示。A~B 为颗粒饲料组和幼体卤虫组斑马鱼的体长 (A) 和体重 (B) 变化 (与幼体卤虫组相比, $**P<0.01$, $*P<0.05$)。C~D 为成体卤虫组和幼体卤虫组雌雄斑马鱼的体长 (C) 和体重 (D) 变化 (分别与幼体卤虫组雌雄斑马鱼相比, $****P<0.0001$, $***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$)。dpf, 受精后日龄。

Note: Data are presented as means \pm SEM ($n=9$). A~B are the body length (A) and body weight (B) changes of zebrafish in dry commercial diets group and larva brine shrimp group (compared with larva brine shrimp group, $**P<0.01$, $*P<0.05$). C-D are the changes in body length (C) and body weight (D) of male and female zebrafish in adult brine shrimp group and larva brine shrimp group (compared with male and female zebrafish in larval brine shrimp group, $****P<0.0001$, $***P<0.001$, $**P<0.01$, $*P<0.05$). dpf, age after fertilization.

图 1 颗粒饲料和成体卤虫对斑马鱼生长的影响

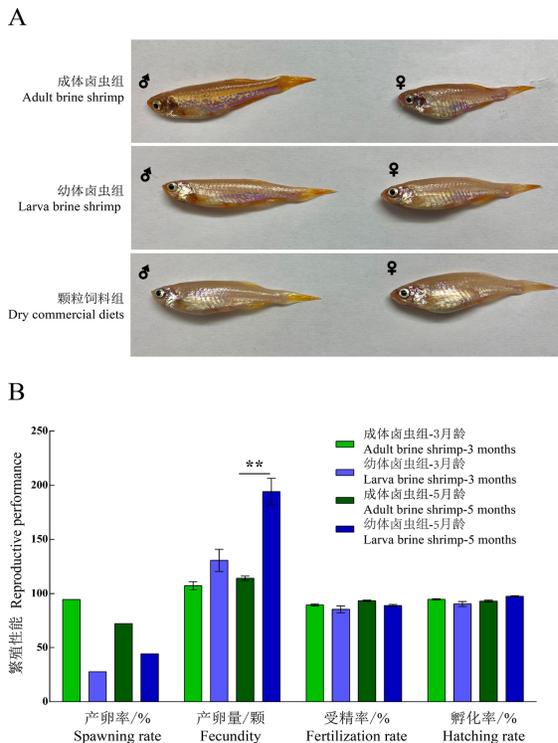
Figure 1 Effects of dry commercial diets and adult brine shrimp on growth of zebrafish

均较大；但是雌雄体色差别很不明显，至89 dpf 仍难以通过体型、体色很好地区分不同性别（图2A）。

2.3.2 繁殖力差异

由于颗粒饲料组的斑马鱼雌雄性征不明显，大部分无法正确区分雌雄。为确保繁殖测试正常进行，尽量区分雌雄后，采取2雌：2雄进行预实验，结果显示产卵率为88%，但单缸产卵量从10~400颗不等，提示雌雄分组不准确，后续无法严格按照1雌：2雄进行配对繁殖测试。因此，后续仅测量并记录成体卤虫组的繁殖性能指标。

图2B结果显示，成体卤虫组的产卵率明显高于幼体卤虫组，3月龄成体卤虫组的产卵率是幼体卤虫组的



注：A，饲喂成体卤虫组、幼体卤虫组或颗粒饲料组斑马鱼的典型外观（♂雄，♀雌）。B，饲喂成体卤虫或幼体卤虫组的3月龄和5月龄斑马鱼产卵率、产卵量、受精率和孵化率比较（每组9条斑马鱼，产卵量、受精率和孵化率均以平均值±标准差表示，** $P<0.01$ 】。

Note: A, the typical appearance of zebrafish (δ male, η female) in dry commercial diets group, adult brine shrimp group and larva brine shrimp group. B is the comparison of spawning rate, spawning amount, fertilization rate and hatching rate of 3-month-old and 5-month-old zebrafish between adult brine shrimp group and larva brine shrimp group (9 zebrafish in each group. Spawning amount, fertilization rate and hatching rate are presented as means \pm SEM, ** $P<0.01$).

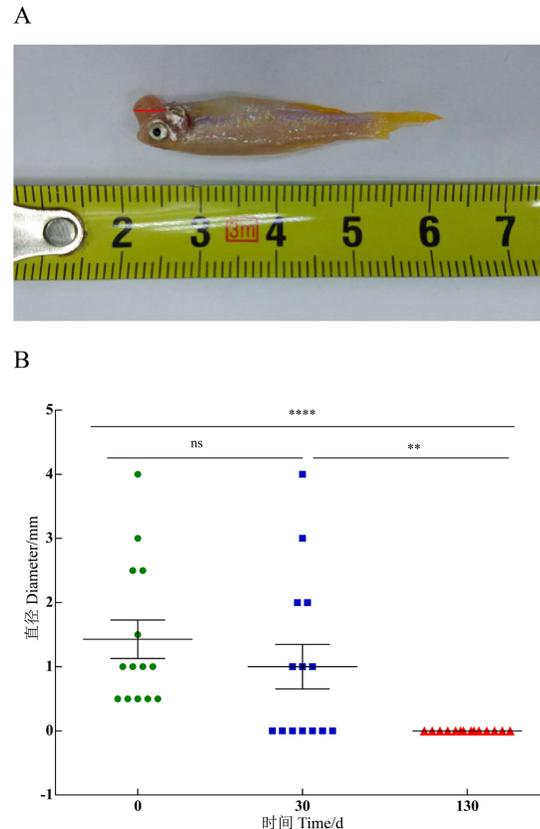
图2 不同饲料对斑马鱼繁殖性能的影响

Figure 2 Effects of different diets on reproductive characteristics of zebrafish

3.5倍，到5月龄时仍存在约1.6倍的差异。与之相反，5月龄时幼体卤虫组的产卵量显著高于成体卤虫组 ($P<0.01$)。而受精率和孵化率方面，2个处理组之间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。综上所述，饲喂成体卤虫显著提高了成年斑马鱼的早期繁殖力，但到5月龄时产卵率和产卵量均有所下降，可能提示成体卤虫难以满足实验室斑马鱼需长期保持高产卵率和产卵量的要求。

2.4 颗粒饲料对斑马鱼其他体征的影响

实验选取的甲状腺肿大病鱼初始（记为0 d）病灶直径为0.5~4 mm不等。在投喂颗粒饲料30 d后，发现部分具有甲状腺肿大病症的斑马鱼其病灶出现消失或者缩小的趋势；在实验进行130 d后，所有实验用鱼的甲状腺肿大病灶均消失（图3）。这提示颗粒饲料可能有治疗斑马鱼甲状腺肿大的作用。



注：A，甲状腺肿大的斑马鱼外观；B，颗粒饲料喂养后的斑马鱼甲状腺直径变化[数据均以平均值±标准差表示 ($n=15$), ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns表示没有统计学差异]。

Note: A, Appearance of Zebrafish with goiter; B, Changes in thyroid diameter of Zebrafish after dry commercial diets feeding [Data are presented as means \pm SEM ($n=15$), * $P<0.01$, **** $P<0.0001$, ns indicated no statistical difference].

图3 颗粒饲料对斑马鱼甲状腺肿大病症的影响

Figure 3 Effect of dry commercial diets on goiter disease of zebrafish

2.5 饲养方案优化后斑马鱼繁殖性能提高

综合以上结果, 将幼体卤虫、颗粒饲料和成体卤虫配合使用, 对饲养方案进一步优化。原饲养方案称为 Du-Lab Zeb's Recipe 1.0, 新饲养方案称为 Du-Lab Zeb's Recipe 2.0。如图4所示, 原饲养方案在仔鱼期(12 dpf前)投喂海水轮虫, 此后仅投喂幼体卤虫(活)作为唯一食物来源。新饲养方案在仔鱼期(12 dpf前)投喂海水轮虫, 幼鱼期(12 dpf~2月龄)投喂幼体卤虫, 2月龄后组合喂食, 即上午保持喂食幼

体卤虫, 下午用颗粒饲料和成体卤虫交替投喂。

测试结果显示, 直至12月龄, 新饲养方案组的产卵率为70%, 高于原饲养方案组的64%; 产卵量为(233.60±3.95)颗, 极显著高于原饲养方案组的(139.40±9.41)颗($P<0.001$); 受精率和孵化率分别为97.47%和90.24%, 显著高于原饲养方案组的94.92%和73.52%(均 $P=0.01$)。这表明, 新饲养方案可显著提升斑马鱼的产卵效率, 并延长其繁殖使用寿命。



图4 新饲养方案 Du-Lab Zeb's Recipe 2.0 示意图

Figure 4 New breeding scheme Du-Lab Zeb's Recipe 2.0

3 讨论

杜久林研究组斑马鱼房(前身为国家斑马鱼中心, 目前改迁至武汉斑马鱼中心)作为国内最早一批以斑马鱼为模式生物的实验室, 始终关注实验鱼的质量控制。目前对于斑马鱼幼苗期(5~15 dpf)的养殖方案, 国家标准 GB/T 39649—2020^[2] 以及国家斑马鱼资源中心均建议投喂草履虫, 并且已经建立了一套比较稳定的实验室养殖程序, 因此大部分国内斑马鱼养殖实验室均采用草履虫进行投喂。但是, 对斑马鱼而言, 轮虫相较于草履虫适口性好, 营养价值高, 稳定性高, 且海水轮虫对于淡水斑马鱼养殖引入外源微生物的风险更小。经过长期探索, 本实验室已成功解决实验室稳定养殖海水轮虫的技术难题, 建立了 Du-Lab Zeb's Recipe 1.0 饲养方案, 即在仔鱼期(12 dpf前)将饵料由草履虫更换为海水轮虫, 此后仅投喂幼体卤虫(活)作为唯一食物来源。本研究旨在继续探索斑马鱼幼鱼期及成鱼期的饵料多样性, 以期建立更加科学合理的

斑马鱼饲养方案, 以保证实验用斑马鱼的科学健康养殖。

对于斑马鱼幼鱼期及成鱼期, 国家标准及国内外权威机构仅建议可喂食多种食物, 但是没有给出明确的饲养方案, 因此大部分斑马鱼实验室仅投喂幼体卤虫。本研究中营养成分分析结果表明, 单一食物幼体卤虫的营养缺陷明显, 仅投喂幼体卤虫不足以提供斑马鱼生长繁殖所需的营养物质。成体卤虫是由卤虫卵孵化出的无节幼体经过几次蜕皮变态发育而成^[18]。成体卤虫多为孤雌生殖, 雌性卤虫的生殖系统能形成两种类型的卵: 冬卵和夏卵。条件差时产冬卵, 冬卵又称休眠卵、耐久卵, 这就是养殖中所使用的卤虫卵。成体卤虫富含蛋白质和脂肪以及碳水化合物等营养素, 是优质天然饵料^[19]。

本研究参考价格、使用效果、口碑、销售量等因素, 选取了两类商品化的观赏鱼饵料以及成体卤虫(冷冻品)进行营养成分分析, 最终确定了颗粒饲料2及成体卤虫进行后续生长繁殖测试。测试结果显示,

颗粒饲料极显著地提高了斑马鱼的生长速率,但是斑马鱼雌雄体色差异和性征不明显,无法开展繁殖测试。此外,颗粒饲料饲养的斑马鱼会出现过度生长、肥胖等营养过剩表型^[20]。据报告,营养过剩对鱼类繁殖性能也有负面影响,例如投喂高n-3高不饱和脂肪酸(n-3 highly unsaturated fatty acids, n-3HUFA)水平的饵料会降低海鲷的总产卵量^[21]。因此,颗粒饲料可以显著提高斑马鱼的生长性能,但无益于甚至减弱生殖性能。

体色是动物的基本特征之一,在其生存和繁殖中发挥着重要作用^[22]。类胡萝卜素水平是影响鱼类体色的主要因素之一^[23],但是鱼类不能从头合成类胡萝卜素,必须从食物中摄取^[24]。本次实验结果显示,在75 dpf时,成体卤虫组的斑马鱼体色鲜艳,性征明显,但是颗粒饲料组和幼体卤虫组均体色暗淡,这可能与成体卤虫富含 β -胡萝卜素有关^[25]。

成体卤虫组在60 dpf~89 dpf期间,雌鱼的体重显著增加,同时其繁殖力也得到了显著提升。之前的研究表明,当发育到60 dpf时,斑马鱼性腺分化结束,卵巢和精巢开始形成,在90 dpf时达到性成熟^[26]。因此,60 dpf~90 dpf是斑马鱼性腺发育成熟的关键时期,在这一时期适当人工添加中链脂肪酸(medium-chain fatty acid, MCFA)和n-3HUFA可以促进斑马鱼雌鱼的繁殖性能和仔鱼成活率的提高^[27]。本研究结果说明,成体卤虫可以满足斑马鱼性腺发育成熟所需的营养,同时提示原饲养方案中幼体卤虫的脂肪酸含量不足,仅投喂幼体卤虫容易导致斑马鱼性腺发育迟缓,性成熟滞后。但是,到繁殖中期(5月龄),成体卤虫组的产卵率下降,而繁殖力受到亲鱼饲料中营养缺乏的影响^[21],这提示长期单一投喂成体卤虫不能满足频繁交配的实验用斑马鱼的营养需求。

本研究中还意外地发现,颗粒饲料对于实验室养殖斑马鱼常见病症甲状腺肿大显著的治愈效果。有研究表明,甲状腺肿大与斑马鱼在摄食过程中碘离子摄取不足显著相关^[28],这说明传统食物幼体卤虫中碘离子缺乏,而颗粒饲料中碘离子含量丰富。

综合以上结果可以发现,颗粒饲料和成体卤虫单独饲养对于斑马鱼的生长和发育有利有弊。本研究明确了颗粒饲料可提高斑马鱼的生长性能,而成体卤虫可提高斑马鱼繁殖性能。同时考虑到幼体卤虫价格便宜,易于消化^[10],且活体食物可以刺激斑马鱼的自然进食^[29]。因此,本平台将幼体卤虫、颗粒饲料和成体

卤虫三者配合使用,对原有的饲养方案进行优化,满足了提高斑马鱼繁殖能力,延长其使用寿命的科研需求。目前,新饲养方案已经在本实验室稳定投入使用超过2年,在此期间观察到斑马鱼体长、体重的增长明显优于原饲养方案,同时鱼体颜色鲜艳,雌雄体色差异明显,3月龄均可明确区分雌雄,且再未发现甲状腺肿大病症的鱼体。

本研究遵循食物多样性的原则,结合实验结果,对实验室斑马鱼的原饲养方案进行了优化,配合使用多种饵料,成功提高了实验室斑马鱼的繁殖性能,并延长其使用寿命,进而更好地保障科学研究的开展,且实现了可操作性、可坚持性和可推广性的目标。对于特殊科研需求的斑马鱼养殖,笔者建议可以对多种食物进行组合实验,进一步优化饲养方案,更好地为科研工作服务。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验已通过中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心动物管理委员会动物福利伦理审核小组审查批准(NA-046-2019)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology (Institute of Neuroscience) (Approval Letter NA-046-2019). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

金仕容负责方案策划、动物实验及初稿写作;
华叶负责实验设计和部分动物实验;
訾化星参与文章思路讨论及部分文章内容的撰写和修改;
杜旭飞参与文章的整体设计,研究内容的讨论;
卜纪雯负责整体研究方案、经费管理和文章审核定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 李阔宇,潘鲁媛,孙永华. 斑马鱼鱼房和养殖系统建设标准[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6):121-127. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.06.018.
LI K Y, PAN L Y, SUN Y H. Standards for constructing zebrafish houses and breeding systems[J]. Chin J Comp Med,

- 2020, 30(6):121-127. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.06.018.
- [2] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 实验鱼质量控制: GB/T 39649—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
State Administration for Market Regulation, China National Standardization Commission. Laboratory animal-Quality control of laboratory fish: GB / T 39649—2020 [S]. Beijing: China Standards Press, 2020.
- [3] 欧阳娟, 薛松磊, 徐妍, 等. 环境因素对丰年虾孵化的影响及孵化条件优化[J]. 中国饲料, 2018(18): 83-86. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20181817.
OUYANG J, XUE S L, XU Y, et al. The effect of environmental factors on the hatching of *Artemia salina* and the optimization of hatching conditions[J]. China Feed, 2018(18): 83-86. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20181817.
- [4] LAWRENCE C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review[J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4): 1-20. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
- [5] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.12.012.
ZHU M X, WANG T Q, ZHANG C Y, et al. Nutritional requirements and current status of diets of laboratory zebrafish and swordtails[J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(12): 61-65. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2009.12.012.
- [6] SPENCE R, FATEMA M K, ELLIS S, et al. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh[J]. J Fish Biol, 2007, 71(1):304-309. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01492.x.
- [7] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 99-102. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.018.
HE J L, LIU J, WANG T Q, et al. Research of zebrafish quality standardization[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2014, 22(6): 99-102. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.018.
- [8] CAHU C, INFANTE J Z. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae[J]. Aquaculture, 2001, 200(1-2):161-180. DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00699-8.
- [9] Baert P, Bosteels T, Sorgeloos P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture [J]. Fao Fisheries Technical Paper, 1996. DOI: <http://tailieu.vn/doc/manual-on-the-production-and-use-of-live-f>.
- [10] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
LI A J. Aquatic animal nutrition and Feed science [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996.
- [11] WATTS S A, POWELL M, D'ABRAMO L R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition[J]. Iilar J, 2012, 53(2):144-160. DOI: 10.1093/ilar.53.2.144.
- [12] 张蓉, 王晓雯, 朱华. 观赏鱼营养需要研究与饲料配制[J]. 中国饲料, 2017(17): 5-9, 17. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20171701.
ZHANG R, WANG X W, ZHU H. Study on nutritional needs of ornamental fish and feed preparation[J]. China Feed, 2017(17): 5-9, 17. DOI: 10.15906/j.cnki.cn11-2975/s.20171701.
- [13] 王强. 浅谈观赏鱼的配合颗粒饲料[J]. 中国园林, 1992, 8(1):57.
WANG Q. 浅谈观赏鱼的配合颗粒饲料[J]. J Chin Landsc Archit, 1992, 8(1):57.
- [14] 汪福保, 罗莉, 王朝明, 等. 鱼类镁营养研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(6): 930-936. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267X.2011.06.007.
WANG F B, LUO L, WANG C M, et al. Recent advances in magnesium nutrition of fish[J]. Acta Zoonutrimenta Sin, 2011, 23(6):930-936. DOI: 10.3969/j.issn.1006-267X.2011.06.007.
- [15] 梁德海. 鱼类对矿物质的营养需要及其缺乏症[J]. 饲料工业, 1998,019(10):25-26. DOI: CNKI:SUN:FEED.0.1998-10-012.
LIANG D H. Nutritional requirement of fish for minerals and its deficiency[J]. Feed Ind, 1998(10): 25-26. DOI: CNKI: SUN: FEED.0.1998-10-012.
- [16] 吴云发, 方春林, 王庆萍. 鱼类矿物质营养研究进展[J]. 江西水产科技, 2007(4): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3188.2007.04.007.
WU Y F, FANG C L, WANG Q P. Research progress of mineral nutrition in fish[J]. Jiangxi Fish Sci Technol, 2007(4): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3188.2007.04.007.
- [17] 韩如政. 维生素对鱼类的营养作用及在饲料中的添加[J]. 饲料工业, 1989(9):34-36.
HAN R. 维生素对鱼类的营养作用及在饲料中的添加[J]. Feed Ind, 1989(9):34-36.
- [18] 曹洪泽, 胡旭辉, 杨树娥. 卤虫的生活习性及其养殖技术[J]. 河北渔业, 2003(4): 45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2003.04.027.
CAO H Z, HU X H, YANG S E. Life habits and culture techniques of *Artemia*[J]. Hebei Fish, 2003(4): 45-46. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6755.2003.04.027.
- [19] 张宏, 陈燕琴. 卤虫的饵料价值与选用[J]. 青海师范大学学报(自然科学版), 2009, 25(1): 67-71. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7542.2009.01.019.
ZHANG H, CHEN Y Q. Feed value and select application of *Artemia*[J]. J Qinghai Norm Univ Nat Sci Ed, 2009, 25(1):67-71. DOI: 10.3969/j.issn.1001-7542.2009.01.019.
- [20] 郑新春, 刘莉, 戴文聪, 等. 过度喂养建立斑马鱼幼鱼肥胖模型[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(1):20-25. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.01.04.
ZHENG X C, LIU L, DAI W C, et al. Establishment of a diet-induced obesity model in zebrafish larvae[J]. J South Med Univ, 2016, 36(1): 20-25. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.01.04.
- [21] IZQUIERDO M S, FERNÁNDEZ-PALACIOS H, TACON A G J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish[M]// Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture. Amsterdam: Elsevier, 2001: 25-42. DOI: 10.1016/b978-0-444-50913-0.50006-0.
- [22] 王梅, 张永勤, 黄靖, 等. 红斑马鱼体色观察及敲除 *mitfa* 基因对其体色发育的影响[J]. 激光生物学报, 2022, 31(1):19-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.01.004.
WANG M, ZHANG Y Q, HUANG J, et al. Observation of red zebrafish body color and the effects of knocking out *mitfa* gene on its body color development[J]. Acta Laser Biol Sin, 2022, 31(1):19-26. DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2022.01.004.
- [23] LECLERCQ E, TAYLOR J F, MIGAUD H. Morphological skin

- colour changes in teleosts[J]. Fish Fish, 2009, 11(2): 159-193. DOI: 10.1111/j.1467-2979.2009.00346.x.
- [24] GOODWIN T. The biochemistry of the carotenoids: volume II animals[M/OL]. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1984. <https://link.springer.com/content/pdf/bfm:978-94-009-5542-4/1.pdf>. DOI: 10.1007/978-94-009-5560-9_11.
- [25] 曹天义, 景晓娜. 人工投喂饵料提高卤虫养殖单产的探究[J]. 水产养殖, 2020, 41(12):40-41, 44.
CAO T Y, JING X. 人工投喂饵料提高卤虫养殖单产的探究[J]. J Aquac, 2020, 41(12):40-41, 44.
- [26] 林小涵, 金超凡, 高晨, 等. MiR-430对斑马鱼原始生殖细胞迁移和性腺发育影响的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(3):72-79. DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20210144.
LIN X H, JIN C F, GAO C, et al. Preliminary functional analysis of miR-430 in regulating zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cell migration and gonad development[J]. Period Ocean Univ China, 2022, 52(3): 72-79. DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20210144.
- [27] 郭盼, 周继术, 吉红, 等. 不同链长脂肪酸对斑马鱼的性腺脂肪酸组成、繁殖力与仔鱼成活率的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 41(4):766-773. DOI: 10.7541/2017.95.
GUO P, ZHOU J S, JI H, et al. Influence of fatty acids with different chain length on fatty acid composition of ovaries, fecundity and survival rate of larvae in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2017, 41(4): 766-773. DOI: 10.7541/2017.95.
- [28] MURRAY K N, WOLF J C, SPAGNOLI S T, et al. Reversibility of proliferative thyroid lesions induced by iodine deficiency in a laboratory zebrafish colony[J]. Zebrafish, 2018, 15(6):558-565. DOI: 10.1089/zeb.2018.1603.
- [29] D'ABRAMO L. Challenges in developing successful formulated feed for culture of larval fish and crustaceans[J]. Avances en Nutrición Acuicola VI, 2002, 143-151.
- (收稿日期: 2023-01-16 修回日期: 2023-04-18)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 周晓铧)

[引用本文]

- 金仕容, 华叶, 訾化星, 等. 一种显著提高实验用斑马鱼繁殖效率和使用寿命的优化养殖方案[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 298-307. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.004.
- JIN S R, HUA Y, ZI H X, et al. An optimized experimental zebrafish breeding scheme for significantly enhancing reproductive efficiency and service life[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 297-306. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.004.

《实验动物与比较医学》出版伦理声明

为加强科研诚信与学术道德建设, 树立良好学风和期刊形象, 建立和维护公平、公正的学术交流生态环境, 《实验动物与比较医学》承诺严格遵守并执行国家有关科研诚信和学术道德的政策与法规。同时, 为促进我国实验动物科学与比较医学科研究成果的国际交流与认可, 本刊参照并遵循国际出版伦理委员会 (Committee on Publication Ethics, COPE) 和国际医学期刊编辑委员会 (International Committee of Medical Journal Editors, ICMJE) 等国际通行的出版伦理规范。因此, 本刊根据目前实际情况, 特做以下声明, 借此规范作者、同行评议专家、期刊编辑等在投稿、审稿、编辑出版全流程中的行为, 并接受学术界和全社会的监督。

1. 所有来稿必须是作者的原创作品, 如文中使用先前发表的资料 (如图、表格), 需要提供相关的版权及许可证明。
2. 本刊坚决抵制第三方代写或代投、抄袭 (即剽窃)、造假 (包括伪造及篡改) 等学术不端行为。一经发现, 编辑部立即撤稿, 该文所有作者均会被列入黑名单。
3. 本刊不接受重复发表文章 (包括不同语种), 也不允许作者一稿多投 (包括同时或错时)。稿件一旦受理, 编辑部将第一时间处理。若作者有加急需求, 可第一时间联系编辑部寻求帮助。
4. 作者投稿前须确认署名及顺序, 所有作者均须对该文的科研诚信负责。投稿时应登记所有署名作者的基本信息, 并在文末附作者贡献说明及利益冲突声明。
5. 若来稿有过投稿他刊的经历, 本刊鼓励作者第一时间如实说明, 并提供以往的审稿意见及修改情况 (包括补充论据或解释说明)。这样的诚信行为有利于该稿在本刊的审稿速度和录用概率。
6. 本刊实行严格的三审制度, 所有来稿均需通过编辑部初审、同行评议专家外审和主编定稿会终审共 3 个审稿环节, 才决定录用与否。
7. 本刊审稿专家和编辑均需公正、尽责对待所有来稿, 对学术不端行为不姑息、不偏袒, 努力维护期刊学术声誉, 并在文章未发表前不随意公开研究内容, 以保障作者的首发权。
8. 所有来稿若涉及学术不端行为 (《CY/T 174—2019: 学术出版规范期刊学术不端行为界定》), 均须由作者本人负责。本刊对已发现的学术不端作者, 保留通报其所在单位及同领域期刊社的权利。

《实验动物与比较医学》编辑部