

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 32—2017

实验动物 爪蟾生产和使用指南

Laboratory animal - Guidelines for the production and use of clawed frog

2017-12-29 发布

2018-01-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出并组织起草。

本标准起草单位：广东省实验动物监测所。

本标准主要起草人：黄韧、李建军、蔡磊、余露军、鞠晨曦、陈梅丽。

实验动物 爪蟾生产和使用指南

1 范围

本标准规定了爪蟾的形态特征、病害、饲料、设施与环境及其检测方法。

本标准适用于非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 和热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 的质量控制。

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。凡是注明日期的引用文件，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 5750 《生活饮用水标准检验方法》

GB/T 6003.1 《试验筛技术要求和检验》

GB/T 6439 《饲料中水溶性氯化物的测定》

GB 13195 《水质水温的测定温度计或颠倒温度计测定法》

GB 14924.1 《实验动物配合饲料通用质量标准》

GB/T 14924.9 《实验动物配合饲料常规营养成分的测定》

GB/T 14924.10 《实验动物配合饲料氨基酸的测定》

GB/T 14924.11 《实验动物配合饲料维生素的测定》

GB/T 14924.12 《实验动物配合饲料矿物质和微量元素的测定》

GB 14925—2010 《实验动物环境及设施标准》

GB/T 18652 《致病性嗜水气单胞菌检验方法》

GB/T 18654.12 《养殖鱼类种质检验 第12部分：染色体组型分析》

HJ 506 《水质溶解氧的测定——电化学探头法》

HJ 586 《水质游离氯和总氯的测定——N,N-二乙基-1,4-苯二胺分光光度法》

NY5072 《无公害食品渔用配合饲料安全限量》

SC/T 1056 《蛙类配合饲料》

SC/T 1077 《渔用配合饲料通用技术要求》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

实验爪蟾 experimental clawed frog

经人工繁育，用于发育生物学、细胞生物学、毒理学、神经学、人类疾病和生殖缺陷模型等科学研究及教学、生产、检测等的两栖类动物，包括非洲爪蟾和热带爪蟾。

3.2

养殖单元 breeding unit

用于爪蟾繁育, 由同一水体及相关设施设备等组成的一個单位。

3.3

配合饲料 formula feed

根据爪蟾营养需要, 将多种饲料原料和添加剂按照一定比例配制的饲料。

3.4

蝌蚪 tadpole

受精卵孵出至尾完全被吸收的爪蟾。

3.5

幼蟾 froglet

尾完全被吸收至接近性成熟的爪蟾。

3.6

成蟾 adult frog

性腺已发育成熟的爪蟾。

3.7

设施 facility

用于爪蟾生产和使用的建筑物及其设备总和。

4 遗传

4.1 分类地位

非洲爪蟾和热带爪蟾隶属于两栖纲(*Amphibia*)、无尾目(*Anura*)、负子蟾科(*Pipidae*)、爪蟾属(*Xenopus*)。

4.2 习性和分布

4.2.1 习性

爪蟾终生水栖, 自然状态下喜栖息于温暖、泥质底的淡水水体中, 早春至早秋期间繁殖, 温度低于 8℃或干旱时进入休眠状态; 适宜温度下, 可常年繁殖。非洲爪蟾可存活 25~30 年, 热带爪蟾可存活 5~20 年。

4.2.2 分布

原产于非洲, 非洲爪蟾分布范围南至南非南部, 北至苏丹东北, 西至尼日利亚西部, 肯尼亚、喀麦隆、刚果共和国也有分布; 热带爪蟾主要分布于塞内加尔至喀麦隆西北部和萨纳加河西部。

4.3 形态特征

4.3.1 非洲爪蟾

成年个体体长 50~140 mm; 后肢有 3 个黑色角质爪(图 1A)。

4.3.2 热带爪蟾

成年个体体长 28~40 mm; 后肢有 3~5 个黑色角质爪, 内跖突发育成第 4 爪(图 1B)。

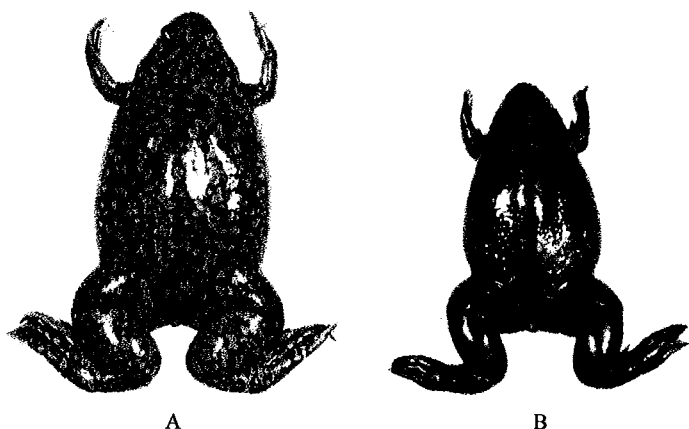


图1 非洲爪蟾和热带爪蟾比较 (Amaya, 1998)

A. 非洲爪蟾; B. 热带爪蟾

4.4 染色体数目

4.4.1 非洲爪蟾

$4N=72$ 。

4.4.2 热带爪蟾

$2N=20$ 。

4.5 饲养管理

见附录 A。

4.6 检测方法

4.6.1 抽样数量

按引进爪蟾数量的 6% 抽样，每次不少于 5 只，最多不超过 30 只，优先抽取可疑样品。

4.6.2 体长

体长为吻端至泄殖腔孔的距离。

4.6.3 染色体

参照 GB/T 18654.12 执行。

4.7 判定

判定方法如下：

a) 形态符合规定，判定为合格；

b) 形态存在差异或不可检测时，补充染色体检测，染色体数目符合规定，判定为合格。

5 病害预防与检测

5.1 主要病原及其症状

爪蟾主要病原及其症状见表 1。

表 1 爪蟾主要病原及其症状

病原	症状
蛙虹彩病毒 <i>Ranavirus</i>	行为呆滞，浮于水面，皮肤有水泡或腐烂，全身性出血，内脏器官有大量出血点，胃胀气；蝌蚪水肿，出血
脑膜炎败血伊利莎白菌 <i>Elizabethkingia meningosepticum</i>	运动机能失调，头部歪斜，身体失去平衡，眼角膜浑浊、发白（白内障），同时伴有皮肤溃疡、肝坏死等症状
致病性嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i> (pathogenic)	行动迟缓，厌食，后腿红肿，严重时后腿肌肉充血呈紫红色，腹部红肿
分枝杆菌 <i>Mycobacterium</i> spp.	行动迟缓，身体瘦弱，皮肤溃疡，肝脏肿大，腹部膨大
水霉 <i>Saprolegnia</i> spp.	嗜睡，浮于水面，病灶部位长“白毛”，并伴随皮肤溃疡、坏死和水肿等症状
毛细线虫 <i>Pseudocapillaroides</i> spp.	严重感染时呼吸困难，行动无力，厌食，背部皮肤出现管状凸痕
小杆线虫 <i>Rhabdias</i> spp.	肺部感染和贫血，生长停滞，肠道有大量幼虫和卵
隐孢子虫 <i>Cryptosporidia</i> spp.	身体消瘦，肠道发炎

5.2 病原控制

5.2.1 隔离检疫

5.2.1.1 运输到达后，应缓慢向运输容器添加养殖水，降低爪蟾应激反应。

5.2.1.2 不同来源、不同批次爪蟾应置于不同养殖单元饲养。

5.2.1.3 隔离期 2 周以上。

5.2.1.4 隔离期间应对进出隔离区域的人员、物品采取病原隔离措施，如人员应穿戴工作服、手套，物品进出前应经消毒处理。

5.2.1.5 隔离检疫结束后，应对隔离区域彻底清洁、消毒。

5.2.2 日常管理

5.2.2.1 养殖设施、设备使用前采用紫外线照射、醋酸熏蒸或 84 消毒液喷洒等消毒处理。

5.2.2.2 养殖水每月采用 0.5 mg/L 高锰酸钾溶液或 2 mg/L 漂白水溶液等至少消毒一次。

5.2.2.3 不同养殖单元的工具不能交叉使用。养殖工具采用 5 mg/L 高锰酸钾溶液等浸泡 30 min 以上，每周至少 1 次。

5.2.2.4 患病个体及时捞出，安乐死后采取深埋、焚烧等处理措施。

5.3 健康检查

5.3.1 每日观察是否出现下列异常情况：

- a) 长时间浮于水面、行为异常或反应迟钝；
- b) 水中有大量脱落的皮肤；
- c) 体表出现瘀斑、溃疡、充血、出血、皮肤粗糙等；
- d) 指（趾）缺失；
- e) 腹部膨大，身体、四肢肿胀，腹部凹陷；
- f) 眼睛浑浊、发白等。

5.3.2 定期（每月至少一次）观察是否出现下列异常情况：

- a) 放大镜或解剖镜观察趾蹼有气泡、出血点、瘀斑等；

- b) 放大镜或解剖镜观察背部皮肤下有线虫引起的管状凸起;
- c) 口腔内有胃的回流物或其他异物、充血、出血、溃疡等;
- d) 泄殖腔肿胀或发红;
- e) 腹部触诊有肿块。

5.3.3 异常情况处理

发现异常个体及时隔离, 分析异常原因, 采取相应处理措施。

5.4 病原检测

5.4.1 检测要求

5.4.1.1 抽样方法

一个养殖单元内随机取样。

5.4.1.2 抽样数量

爪蟾: 按取样单元群体数量的 5% 抽样, 每次抽样不少于 5 只, 最多不超过 30 只。

水样: 抽取 25 mL 水样。

5.4.1.3 检测指标

蛙虹彩病毒、脑膜炎败血伊利莎白菌、致病性嗜水气单胞菌为必检指标, 其他为必要时检测指标。

5.4.1.4 检测频率

每 6 个月至少检测 1 次。

5.4.2 检测方法

5.4.2.1 细菌

按附录 B.1~B.3 方法执行, 常用培养基的配制方法见附录 C。

5.4.2.2 真菌

按附录 B.4 的方法执行。

5.4.2.3 病毒

按附录 D 的方法执行。

5.4.2.4 寄生虫

按附录 E 的方法执行。

5.4.3 判定

养殖单元内的爪蟾和水样如检出蛙虹彩病毒、脑膜炎败血伊利莎白菌或致病性嗜水气单胞菌, 则判定该养殖单元内的爪蟾不合格。

6 饲料

6.1 配合饲料分类

爪蟾配合饲料分为蝌蚪粉料、蝌蚪颗粒料、幼蟾颗粒料和成蟾颗粒料 4 个类别, 各类饲料规格应符合表 2 的要求。

表 2 饲料分类与规格

饲料类别	非洲爪蟾		热带爪蟾	
	适用对象（日龄）/d	规格（粒径）/mm	适用对象（日龄）/d	规格（粒径）/mm
蝌蚪粉料	7~38	0.2~0.5	7~35	0.1~0.5
蝌蚪颗粒料	39~60	0.5~1.0	36~55	0.5~1.0
幼蟾颗粒料	61~500	1.0~3.0	56~150	1.0~2.0
成蟾颗粒料	>500	3.0~5.0	>150	2.0~3.0

6.2 技术要求

6.2.1 原料要求

应符合 GB/T 14924.1 的规定。

6.2.2 感官指标

色泽、颗粒大小均匀；无霉变、变质、结块和虫蛀现象；无霉味、酸败等异味。

6.2.3 加工质量指标

应符合表 3 的规定。

表 3 爪蟾饲料加工质量指标

指标	粉料	颗粒料
原料粉碎粒度（筛上物）/% （筛孔尺寸 0.250 mm）	≤5.0 ^a	≤5.0 ^b
混合均匀度（变异系数）/%	≤10.0	
水中稳定度（溶失率）/%	—	浸泡 60 min，颗粒不开裂，表面不开裂，不脱皮

a 采用“ø 200×50-0.180/0.125”实验筛筛分（GB/T 6003.1）；

b 采用“ø 200×50-0.180/0.160”实验筛筛分（GB/T 6003.1）。

6.2.4 营养成分指标

爪蟾配合饲料常规营养成分指标应符合表 4 的规定，氨基酸、维生素、矿物质和微量元素成分推荐值见附录 F。

表 4 常规营养成分指标

饲料种类 \ 指标	粗蛋白 ≥/%	粗脂肪 ≥/%	粗纤维 ≤/%	粗灰分 ≤/%	氯化钠 ≤/%	水分 ≤/%	钙 ≤/%	总磷 ≥/%
蝌蚪粉料	41	4	5	15	1	10	5	1.2
蝌蚪颗粒饲料	40	4	5	15	1	10	5	1.2
幼蟾颗粒饲料	38	4	6	15	1	10	5	1.2
成蟾颗粒饲料	35	4	6	15	1	10	5	1.2

6.2.5 卫生指标

应符合 NY5072 的规定。

6.3 检测方法

6.3.1 感官指标、原料粉碎粒度、混合均匀度、水中稳定性和卫生指标

按照 SC/T 1056 的规定执行。

6.3.2 配合饲料常规营养成分、氨基酸、维生素、矿物质和微量元素指标

分别按照 GB/T 14924.9~GB/T 14924.12 的规定执行,氯化钠按照 GB/T 6439 的规定执行。

6.4 检测规则

按照 SC/T 1056 的规定执行。

7 设施与环境

7.1 设施

7.1.1 地面、内墙和天花板都应使用无毒材料,且应易于清洗和消毒。

7.1.2 应配备应急电源和漏电保护开关,电箱、插座和灯管等用电设施应有防水装置。

7.1.3 门窗、下水道等与外界连通的部位应有预防敌害生物进入的设施。

7.2 设备

7.2.1 养殖缸

a) 选用无毒材质;

b) 无锐边、尖角,内外壁光滑;

c) 应配有观察、投喂、换水及防逃装置。

7.2.2 辅助设备

应配有温湿度控制、照明、水质监测与消毒等辅助设备。

7.3 环境

7.3.1 养殖间环境

7.3.1.1 噪声小于 60 dB。

7.3.1.2 工作照度 ≥ 200 lx。

7.3.2 水环境

7.3.2.1 水环境指标

爪蟾水环境指标应符合表 5 的要求。

表 5 水环境指标

项目	非洲爪蟾	热带爪蟾
水温/ $^{\circ}\text{C}$	18~24	22~28
电导率/ $(\mu\text{S}/\text{cm})$	500~3000	500~1000
总硬度 $(\text{CaCO}_3)/(\text{mg}/\text{L})$	150~300	100~300
总碱度 $(\text{CaCO}_3)/(\text{mg}/\text{L})$	50~200	
酸碱度(pH)	蝌蚪(7.0~8.0) 幼蟾、成蟾(6.5~8.5)	
溶解氧含量 $\geq/(\text{mg}/\text{L})$	5	

续表

项目	非洲爪蟾	热带爪蟾
余氯 $\leq$ / ($\mu\text{g/L}$)	0.2	
非离子氨 $\leq$ / (mg/L)	0.02	
亚硝酸盐氮 $\leq$ / (mg/L)	0.5	
硝酸盐氮 $\leq$ / (mg/L)	50	
照度 $\leq$ /lx	500	
昼夜明暗交替时间/h	12/12	

7.3.2.2 病原指标

养殖水中不得携带蛙虹彩病毒、脑膜炎败血伊利莎白菌、致病性嗜水气单胞菌。

7.4 检测方法

病原检测按照 5.4 的方法执行；环境检测按照附录 G 执行。

7.5 检测频率

环境指标应至少每 6 个月检测 1 次。

附录 A

(资料性附录)

饲养管理

A.1 繁殖

A.1.1 亲蟾选择

选择体质无伤病、无畸形、非近亲个体作为亲蟾。雄蟾应躯体雄健、前肢粗壮、婚垫明显；雌蟾应体型丰满、腹部膨大柔软而富有弹性、卵巢轮廓明显可见、生殖孔微红微突。

A.1.2 繁殖

A.1.2.1 人工催产

向爪蟾背部淋巴囊内注射 HCG 激素，雌性单只注射量为 200 IU，雄性单只注射量为 100 IU，注射完毕的雌雄亲蟾分开饲养，配对当天再次分别注射 100 IU HCG 激素。

A.1.2.2 自然受精

将注射后的雌、雄亲蟾置于深度约为 16 cm、NaCl 浓度为 20 mmol/L 的水中配对过夜，次日清晨收集受精卵。

A.1.2.3 人工授精

A.1.2.3.1 取卵

沿泄殖腔方向轻轻滑动挤压腹部，一般 1~2 min 后开始排出卵子，24 h 内可按照此种方法收集卵子 4~6 次，用无菌培养皿承接成熟卵子，取卵后爪蟾应休养 3~6 个月；也可通过手术取卵方式获得成熟卵子。

A.1.2.3.2 取精

可通过迅速处死雄蟾方式获得精子。

A.1.2.3.3 授精

MMR 溶液使用前于 25℃ 预热，将获取的卵子和精子置于盛有 0.5 × MMR (Marc's Modified Ringer's) 溶液的无菌培养皿中混合 5 min。MMR 溶液配方见附表 A.1。

附表 A.1 MMR 溶液配方

化学试剂	1×储备液	20×储备液
KCl	2 mmol/L	40 mmol/L
MgSO ₄	1 mmol/L	20 mmol/L
CaCl ₂	2 mmol/L	40 mmol/L
NaCl	0.1 mmol/L	2 mmol/L
HEPES	5 mmol/L	100 mmol/L

A.2 孵化

A.2.1 孵化密度

直径为 90 mm 的培养皿中孵化的受精卵不超过 100 粒, 尽量使卵分散; 根据胚胎发育情况, 及时调整孵化密度。

A.2.2 孵化条件

孵化液为 $0.5 \times \text{MMR}$; 非洲爪蟾孵化温度为 20°C , 热带爪蟾孵化温度为 25°C ; 每天更换孵化液 1 次; 及时移除死亡胚胎。

A.3 蝌蚪期饲养

A.3.1 5 日龄前蝌蚪

不投喂, 不充氧, 于 0.75 g/L 的盐水中养殖; 每天更换 50% 养殖水, 换水前后水质因子尽量一致。

A.3.2 6 日龄蝌蚪至尾完全被吸收

2 周后开始充气, 投喂配合饲料; 每天投喂 3~8 次; 每次投喂量以 15 min 内吃完为宜; 及时清理粪便残饵。

A.4 幼成蟾饲养

A.4.1 投喂

每天投喂配合饲料 1 次, 投喂量以 1~2 h 内吃完为宜, 进食期间保持安静, 进食 3~4 h 后清除粪便残饵, 避免爪蟾应激反刍。

A.4.2 换水

静水养殖每 2 天换水 1 次, 每次换水量 100%, 循环水养殖系统每周换水 1/3; 换水前后水质因子尽量一致。

A.5 爪蟾养殖密度

爪蟾养殖密度见附表 A.2。

附表 A.2 爪蟾养殖密度

(单位: 只/10L)

发育阶段 \ 种类	爪蟾养殖密度	
	非洲爪蟾 ≤	热带爪蟾 ≤
蝌蚪	100	150
幼蟾	5	10
成蟾	1	3

A.6 日常管理

A.6.1 每天巡查饲养设施设备, 并观察爪蟾生活状态。

A.6.2 定期监测水质指标。

A.7 运输

A.7.1 包装

内包装应由无毒材料制成。

A.7.2 标签

每一运输容器应携带标明爪蟾名称、来源、数量、规格等信息的标签。

A.7.3 温度

非洲爪蟾适宜的运输温度为 15~27℃，热带爪蟾为 18~30℃。

A.7.4 密度

运输前一天禁食，运输密度不超过养殖密度的 5 倍。

A.7.5 时间

运输不宜超过 48 h。

附录 B

(规范性附录)

细菌和真菌鉴定方法

B.1 脑膜炎败血伊丽莎白菌

B.1.1 采样

无菌采取爪蟾肝脏或脑组织。

B.1.2 分离培养

将样本接种于营养琼脂平板, $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 48 h。

B.1.3 鉴定

挑选营养琼脂平板上可疑脑膜炎伊丽莎白菌菌落, 染色镜检, 将符合脑膜炎伊丽莎白菌菌体特征的菌落接种于营养琼脂平板纯化培养, 置 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 48 h, 挑取新鲜菌落进行生化试验。

B.1.3.1 菌落特征

培养 48 h 后菌落呈微黄色或亮黄色。

B.1.3.2 菌体特征

革兰氏阴性、细长杆菌, 单个分散排列。

B.1.3.3 生化鉴定

氧化酶阳性, 葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、果糖产酸, 不发酵木糖、蔗糖、乳糖, 不还原硝酸盐, β -半乳糖苷酸、DNA 酶阳性。也可采用生化鉴定试剂盒进行鉴定。

B.1.4 结果判定

经鉴定符合 B.1.3 中各项检测结果, 或根据生化鉴定试剂盒鉴定为脑膜炎败血伊丽莎白菌。

B.2 致病性嗜水气单胞菌

B.2.1 采样

无菌采取爪蟾肝脏或肾脏组织。

B.2.2 分离培养

将样本接种于营养琼脂平板, $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h。

B.2.3 鉴定和结果判定

挑选营养琼脂平板上可疑菌落, 染色镜检, 将符合嗜水气单胞菌菌体特征的菌落接种于营养琼脂平板纯化培养, 置 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h, 挑取新鲜菌落进行生化试验。

按 GB/T 18652 进行鉴定和结果判定。也可采用生化鉴定试剂盒进行鉴定。

B.3 分枝杆菌

B.3.1 采样

无菌采取爪蟾肝或肾组织。

B.3.2 分离培养

将样本接种于罗氏培养基，28~32℃恒温培养 15~30 天。

B.3.3 鉴定

B.3.3.1 菌落特征

黄色或灰白色（避光培养）凸起的粗糙菌落。

B.3.3.2 菌体特征

挑选可疑菌落（或直接取肾组织涂片），抗酸染色呈红色。

B.3.3.3 PCR 鉴定

按附录 D 的方法进行。

B.3.4 结果判定

经鉴定符合 B.3.3 中各项检测结果，可判定为分枝杆菌。

B.4 水霉

B.4.1 镜检

a) 取皮肤病灶组织镜检，可见真菌孢子和菌体。

b) 水霉寄生时，体表成片“白毛”即是水霉的菌丝，菌丝直径 15~20 μm；菌丝中有多个细胞核，无横隔，菌丝顶端膨大形成孢子囊。

B.4.2 PCR 鉴定

按附录 D 的方法进行。

B.4.3 结果判定

符合 B.4.1 和 B.4.2 中各项检测结果，可判定为水霉。

附 录 C

(资料性附录)

培养基配制方法

C.1 普通琼脂平板

牛肉膏	3.0 g
蛋白胨	10.0 g
氯化钠	5.0 g
磷酸二氢钾	1.0 g
琼脂	15.0 g

上述各成分加入蒸馏水中,加热溶化,pH 7.2~7.4,补足蒸馏水至 1000 mL,分装后,121℃灭菌 20 min。

C.2 罗氏培养基

L-谷氨酸钠	14.4 g
KH ₂ PO ₄	4.8 g
MgSO ₄	0.48 g
枸橼酸镁	1.2 g
甘油	24 mL
马铃薯淀粉	60 g

上述各成分加入蒸馏水中,加热溶化,pH 8.4~8.6,补足蒸馏水至 1200 mL,分装后,121℃灭菌 20 min,备用。

上述培养基冷却至 55℃时,以无菌操作加入新鲜鸡蛋卵液 2000 mL(鸡蛋卵液的制备:洗净新鲜鸡蛋表面,浸泡在 70%乙醇或其他消毒液中 20~30 min,取出,擦干,开口,收集鸡蛋卵液,经过消毒纱布过滤成鸡蛋卵液),混匀;加入 2%孔雀绿水溶液 20 mL,混匀;静置 1 h 后,倒平板,85℃放置 1 h 后,放入冰箱备用。

附录 D

(规范性附录)

微生物PCR检验方法

D.1 基因组 DNA 的提取

病毒取实验爪蟾脾脏组织、真菌取皮肤组织、细菌取纯培养物或病灶组织，按照常规方法提取 DNA，双蒸水溶解后于-20℃保存备用。阳性对照分别为：确定感染病毒和真菌的组织样本，细菌为模式菌株，病毒、真菌阴性对照为确定健康组织样本，细菌阴性对照为大肠杆菌 ATCC25922 株，空白对照为双蒸水。

D.2 PCR 扩增

PCR 扩增引物序列及反应条件见附表 D.1。

PCR 总反应体积为 50 μL，其中含：10 × PCR Buffer 5 μL (Mg²⁺ Plus)，dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL，上、下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μL，基因组 DNA 4 μL (100~500 ng)，Taq 酶 (5 U/μL) 0.4 μL，双蒸水补齐至 50 μL。

D.3 琼脂糖凝胶电泳

在电泳缓冲液中加入 1 % 琼脂糖，加热融化后加入溴化乙锭制备凝胶，凝固后进行电泳。8 μL PCR 产物加入 2 μL 5 × 上样缓冲液，混匀后加入上样孔，120 V 恒压电泳 20 min，紫外线透射检测。

D.4 序列测序

PCR 产物经回收纯化后，在 DNA 测序仪上测序；为保证测序的可靠性和准确性，采用双向测序，并进行人工核对、校正。

D.5 结果及判定

D.5.1 试验结果成立条件

阳性对照出现附表 D.1 中相应的目的条带，阴性对照和空白对照没有目的条带出现，试验结果成立；否则，结果不成立。

D.5.2 普通 PCR

琼脂糖凝胶电泳后，在空白和阴、阳性对照成立的情况下，待检样品若没有出现附表 D.1 中相应的目的条带，则判定目标病原核酸阴性；待检样品若出现附表 D.1 中相应的目的条带，则需进一步序列测定。

D.5.3 测序

按 D.4 进行测序，结果采用 BLAST 程序 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与 GenBank 中已登录的相应基因序列进行序列同源性分析，序列同源性在 90% 以上，即可判定待检样本目标病原核酸阳性；否则判定目标病原核酸阴性。

附表 D.1 爪蟾病原微生物 PCR 检测靶基因、引物序列和反应条件

菌种	靶基因	引物序列 (5'→3')	扩增片段/bp	PCR 反应条件
虹彩病毒	MCP	CGCATGTCTTCTGTAAC TGG	1392	95℃、4 min; 94℃、30 s, 50℃、30 s, 72℃、60 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min
		CGTTACAAGATTGGGAATCC		
		CGCGATAGGCTACTATAACATGG	500	95℃、4 min; 94℃、30 s, 52℃、30 s, 72℃、45 s, 30 个循环; 72℃延伸 10 min
		AGATGTGTGACGTTCTGCACC (巢式引物)		
分枝杆菌	16S	GCG AAC GGG TGA GTA ACA CG	924	95℃、4 min; 94℃、30 s, 50℃、1 min, 72℃、1 min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min
		TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA		
	rRNA	AAT GGG CGC AAG CCT GAT G	300	
		ACC GCT ACA CCA GGA AT (巢式引物)		
水霉	ITS	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	744	95℃、4 min; 94℃、30 s, 58℃、30 s, 72℃、60 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min
		TCCTCCGCTTATTGATATGC		

附录 E

(资料性附录)

寄生虫特征

E.1 寄生虫形态及寄生部位

E.1.1 毛细线虫

虫体细长，白色、圆线形，前端钝圆，体表有许多小乳突，具有坚硬角质层，体长 2~4 mm (附图 E.1)。主要寄生于背部皮肤，呈管状凸起；刮取体表白斑皮肤或水体沉积物中可见成体和幼体。

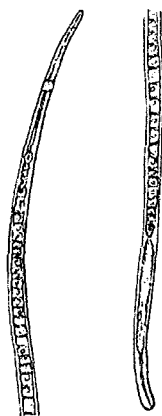
E.1.2 小杆线虫

虫体透明、纤细，无分节，两侧对称，具有充满体液的假体腔，体表具有角质层，体长 1 mm 左右 (附图 E.2)。成体寄生在肺部，肠道内有大量幼体和虫卵。

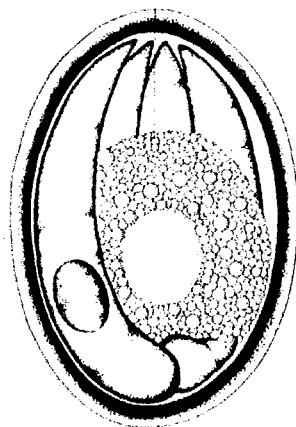
E.1.3 隐孢子虫

卵形或梨形，卵囊平均大小为 $5.43\ \mu\text{m} \times 4.38\ \mu\text{m}$ (附图 E.3)。主要寄生在肠道等部位。

E.2 寄生虫形态图



附图 E.1 毛细线虫 (Køie et al., 2001)



附图 E.2 隐孢子虫 (Current et al., 1986)

附 录 F

(资料性附录)

配合饲料氨基酸、维生素、矿物质和微量元素推荐值

F.1 配合饲料氨基酸推荐值见附表 F.1。

附表 F.1 配合饲料氨基酸推荐值

指标	含量	指标	含量
精氨酸/%	2.46~2.57	亮氨酸/%	2.77~3.10
赖氨酸/%	1.70~2.63	异亮氨酸/%	1.49~1.72
甲硫氨酸/%	0.76~0.80	苯基丙氨酸/%	1.44~1.77
胱氨酸/%	0.59~0.93	酪氨酸/%	1.16~1.96
色氨酸/%	0.34~0.45	苏氨酸/%	1.43~1.54
组氨酸/%	0.74~1.12	缬氨酸/%	1.48~2.00

F.2 配合饲料维生素推荐值见附表 F.2。

附表 F.2 配合饲料维生素推荐值

指标	含量	指标	含量
维生素 A/ (IU/kg)	7400~14000	泛酸/ (mg/kg)	34~100
维生素 D ₃ / (IU/kg)	2000~2400	胆碱/ (mg/kg)	2640~3230
维生素 E/ (IU/kg)	83.7~175	维生素 B ₆ / (mg/kg)	12~32
维生素 B ₁ / (mg/kg)	15~36	叶酸/ (mg/kg)	7.0~8.51
维生素 B ₂ / (mg/kg)	11~37	生物素/ (mg/kg)	0.6~0.73
烟酸/ (mg/kg)	100~240	维生素 B ₁₂ / (μg/kg)	58~140
维生素 K/ (mg/kg)	5.0~5.85		

F.3 配合饲料矿物质和微量元素推荐值见附表 F.3。

附表 F.3 配合饲料矿物质和微量元素推荐值

指标	含量	指标	含量
钾/%	0.6~1.2	锌/ (mg/kg)	102~240
钠/%	0.27~0.51	锰/ (mg/kg)	77~120
镁/%	0.19~0.23	铜/ (mg/kg)	16~42
氯化物/%	0.43~0.70	硒/ (mg/kg)	0.09~0.94
铁/ (mg/kg)	296~540	碘/ (mg/kg)	1.2~2.3

附录 G

(资料性附录)

养殖间环境和水环境指标检测方法

G.1 养殖间环境指标检测方法见附表 G.1。

附表 G.1 养殖间环境指标检测方法

项目	检测方法
噪声/dB	GB 14925—2010
照度/lx	GB 14925—2010

G.2 水环境指标检测方法见附表 G.2。

附表 G.2 水环境指标检测方法

项目	检测方法
水温/℃	GB 13195
电导率/($\mu\text{S}/\text{cm}$)	GB/T 5750
总硬度(CaCO_3)/(mg/L)	GB/T 5750
总碱度(CaCO_3)/(mg/L)	GB/T 5750
酸碱度(pH)	GB/T 5750
溶解氧含量 $\geq$ /(mg/L)	HJ 506
余氯 $\leq$ /($\mu\text{g}/\text{L}$)	HJ 586
非离子氨 $\leq$ /(mg/L)	GB/T 5750
亚硝酸盐氮 $\leq$ /(mg/L)	GB/T 5750
硝酸盐氮 $\leq$ /(mg/L)	GB/T 5750
照度/lx	GB 14925—2010
昼夜明暗交替时间/h	GB 14925—2010

参考文献

陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 2011, 淡水鱼细菌性败血症. 中国水产, (3): 54-55.
陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 2012. 蛙脑膜炎败血金黄杆菌病. 中国水产, (5): 51-52.
全国动物防疫标准化技术委员会. 2002. GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法.
沈国鑫. 2008. 热带爪蟾繁殖生物学及其人工养殖研究. 南昌: 南昌大学硕士学位论文.
世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会组织. 2000. 水生动物疾病诊断手册. 北京: 中国农业出版社.

- Bravo Fariñas L, Monté Boada RJ, Cuéllar Pérez R, et al. 1989. *Aeromonas hydrophila* Infection in *Xenopus laevis*. Revista Cubana de Medicina Tropical, 41 (2): 208-213.
- Brayton C. 1992. Wasting disease associated with cutaneous and renal nematodes, in commercially obtained *Xenopus laevis*. Ann N Y Acad Sci, 653: 197-201.
- Chai N, Deforges L, Sougakoff W, et al. 2006 *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). J Zoo Wildlife Med, 37: 55-58.
- Clothier RH, Balls M. 1973. Mycobacteria and lymphoreticular tumours in *Xenopus laevis*, the South African clawed toad. I. Isolation, characterization and pathogenicity for *Xenopus* of *M. marinum* isolated from lymphoreticular tumour cells. Oncology, 28: 445-457.
- Cunningham AA, Sainsbury AW, Cooper JE. 1996. Diagnosis and treatment of a parasitic dermatitis in a laboratory colony of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Vet Rec, 138: 640-642.
- DB 43/T 1020—2015 非洲爪蟾室内养殖技术规程.
- Godfrey D, Williamson H, Silverman J, et al. 2007. Newly identified *Mycobacterium* species in a *Xenopus laevis* colony. Comp Med, 57: 97-104.
- Green SL. 2009. The laboratory *Xenopus* sp. CRC Press.
- Green SL, Bouley DM, Josling CA, et al. 2003. *Cryptosporidiosis* associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory South African clawed frog (*Xenopus laevis*). Comp Med, 53 (1): 81-84.
- Green SL, Bouley DM, Tolwani RJ, et al. 1999. Identification and management of an outbreak of *Flavobacterium meningosepticum* infection in a colony of South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) Am Vet Med Assoc, 214: 1833.
- Green SL, Lifland BD, Bouley DM, et al. 2000. Disease attributed to *Mycobacterium chelonae* in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Comp Med, 50: 675-679.
- Hill WA, Newman SJ, Craig LE, et al. 2010. Diagnosis of *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium* species, and *Batrachochytrium dendrobatidis* in an African clawed frog (*Xenopus laevis*). Journal of The American Association for Laboratory Animal Science, 49 (2): 215-220.
- Jaffkins A, Abu-Daya A, Noble A, et al. 2012. Husbandry of *Xenopus tropicalis*. *Xenopus* Protocols: Post-genomic Approaches, 17-31.
- Mveobiang A, Lee RE, Umstot ES, et al. 2005. A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus species* with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. Infection and Immunity, 73 (6): 3307-3312.
- Poynton S L, Whitaker BR. 2001. Protozoa and metazoa infecting amphibians. Amphibian Medicine and Captive Husbandry, Krieger Publishing Company, Malabar, FL, USA, 193-222.
- Pritchett KR, Sanders GE. 2007. Epistylididae ectoparasites in a colony of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). Am Assoc Lab Anim Sci, 46: 86-91.
- Reed BT. 2005. Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. London: Royal Society of the Prevention of Cruelty to Animals, Research Animals Department.
- Robert J, Abramowitz L, Morales HD. 2007. *Xenopus laevis*: a possible vector of *Ranavirus* infection. Wildlife Dis, 43 (4): 645-652.
- Robert J, George E, Andino FDJ, et al. 2011. Waterborne infectivity of the *Ranavirus* frog virus 3 in *Xenopus laevis*. Virology, 417 (2): 410-417.
- Sánchez-Morgado J, Gallagher A, Johnson LK. 2009. *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Lab Anim, Feb 23.

- Schaeffer DO, Kleinow KM, Krulisch L. 1992. The care and use of amphibians, reptiles, and fish in research.
- Schwabacher H. 1959. A strain of *Mycobacterium* isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. Hyg (Lond), 57: 57-67.
- Sherril L. 2010. Green. The Laboratory *Xenopus* sp. Boca Raton: CRC Press.
- Suykerbuyk P, Vleminckx K, Pasmans F, et al. 2007. *Mycobacterium liflandii* infection in European colony of *Siluranatropicalis*. Emerg Infect Dis, 13: 743-746.
- Trott KA, Stacy BA, Lifland BD, et al. 2004. Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Comp Med, 54: 309-317.