



中华人民共和国国家标准

GB/T 39649—2020

实验动物 实验鱼质量控制

Laboratory animal—Quality control of laboratory fish

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 种质鉴定	2
5 遗传管理	3
6 微生物和寄生虫监测	4
7 饲料	5
8 环境设施	6
附录 A (规范性附录) 实验鱼 DNA 条形码引物及序列	9
附录 B (资料性附录) 实验鱼寄生虫的鉴定	11
附录 C (规范性附录) 实验鱼微生物分离、培养及鉴定	13
附录 D (资料性附录) 草履虫培育与投喂	16
附录 E (资料性附录) 褶皱臂尾轮虫培育与投喂	17
附录 F (资料性附录) 卤虫孵化与投喂	18
附录 G (资料性附录) 实验鱼饲养密度	19
附录 H (资料性附录) 实验鱼环境指标检测方法	20
参考文献	21

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC 281)提出并归口。

本标准起草单位:广东省实验动物监测所、中国科学院水生生物研究所、中国水产科学研究院珠江水产研究所、上海实验动物研究中心、中国医学科学院医学实验动物研究所。

本标准主要起草人:黄韧、孙永华、李凯彬、胡建华、李建军、余露军、蔡磊、刘云波、林金杏、潘鲁媛、吴淑勤、陈梅丽。

实验动物 实验鱼质量控制

1 范围

本标准规定了实验鱼的种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料、环境设施的质量控制及其监测方法。

本标准适用于斑马鱼(*Danio rerio*)、剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)和诸氏鲮鲤虎鱼(*Mugilogobius chulae*)的种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料、环境设施的质量控制。

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。凡是注日期的引用文件,仅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 5749 生活饮用水卫生标准

GB/T 5750(所有部分) 生活饮用水标准检验方法

GB 8978 污水综合排放标准

GB 14925 实验动物 环境及设施

GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法

GB/T 18654.3 养殖鱼类种质检验 第3部分:性状测定

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

NY 5052 无公害食品 海水养殖用水水质

SC/T 6040 水产品工厂化养殖装备安全卫生要求

SC/T 7214.1 鱼类爱德华氏菌检测方法 第1部分:迟缓爱德华氏菌

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验鱼 laboratory fish



经人工繁育,对其遗传、微生物、寄生虫、饲料和环境设施进行控制,用于科学研究、教学、生产、检测、鉴定及其他科学实验的鱼类。

3.2

鳍式 fin formula

表示鱼鳍的组成、结构和鳍条的类别、数目的公式。

注:一般以“D.”代表背鳍,“A.”代表臀鳍,“P.”代表胸鳍,“V.”代表腹鳍,“C.”代表尾鳍;鳍棘数目用大写罗马字母表示,不分枝鳍条数目用小写罗马数字表示,分枝鳍条数目用阿拉伯数字表示;棘或鳍条的数目范围以“~”表示,棘与鳍条相连时用“—”表示,分离时用“,”隔开。

3.3

生物饵料 living feeds

经过人工筛选的、可进行人工培养且适合养殖对象采食的生物。

3.4

配合饲料 formula feeds

根据实验鱼的营养需要,将多种饲料原料按饲料配方经工业化生产的均匀混合物。

4 种质鉴定

4.1 种质要求

4.1.1 形态

实验鱼形态特征见表1。

表1 实验鱼形态特征

实验鱼	形态特征
斑马鱼	a) 体呈纺锤形,尾鳍长且呈叉形; b) 背部橄榄色;体侧鳃盖后缘至尾末位置,雄鱼有数条深蓝色和柠檬色相间纵纹,雌鱼则为蓝色和银灰色相间纵纹; c) 鳍式为 D. ii—5~8; A. ii~iii—10~14; P. i—9~13; V. i—5~7
剑尾鱼	a) 头较尖,吻突出,口中等大,下颌微突出;背鳍起点在臀鳍基部上方,胸鳍末端可达腹鳍基部,腹鳍末端超过臀鳍基部,尾鳍较大; b) 雌鱼腹部圆大;雄鱼体型细长和侧扁,尾鳍下缘突出呈剑状; c) 鳍式为 D. 11~15; A. 7~11; V. 6~7
诸氏扁虾虎鱼	a) 第一背鳍第二至第四鳍棘末端延长呈丝状,以第二和第三鳍棘最长;第一背鳍下的颈背部有斜行带状条纹,尾鳍基部有两个垂直排列的圆形或椭圆形斑点; b) 鳍式为 D. V~VI, I—6~10; A. I—5~10; P. 12~17; V. I—7~12

4.1.2 DNA 条形码

DNA 条形码序列歧异度应小于或等于 1.0%。

4.2 检验

4.2.1 抽样

按抽样单元群体数量的 5% 抽样,每次抽样不少于 5 尾,不超过 30 尾。标注样品名称、来源、数量、抽样人和抽样时间等信息。

4.2.2 形态检验

按照 GB/T 18654.3 的规定执行。

4.2.3 DNA 条形码检验

4.2.3.1 基因组 DNA 提取

按照 GB/T 19495.3 的方法或采用具有相同效果的动物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

4.2.3.2 聚合酶链式反应(PCR)扩增

引物序列见附录 A 中表 A.1。PCR 总反应体积为 50 μ L,其中含 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L,dNTP(含

dCTP、dATP、dGTP、dTTP 各 2.5 mmol/L) 4 μ L, 上、下游引物各 2 μ L (终浓度为 0.2 μ mol/L ~ 1.0 μ mol/L), 基因组 DNA 2 μ L (总量 100 ng ~ 1 000 ng), Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.5 μ L, 双蒸水补齐至 50 μ L。PCR 反应程序如表 2 所示。

表 2 DNA 条形码检验 PCR 反应程序

步骤	温度 ℃	时间	循环数
预变性	94	4 min	1
变性	94	30 s	30
退火	52	30 s	
延伸	72	40 s	
延伸	72	10 min	1

4.2.3.3 序列测定

PCR 产物经回收纯化后, 双向测序, 并进行人工核对、校正。

4.2.3.4 序列歧异度计算

实验鱼的 DNA 条形码序列见表 A.2。序列歧异度 D 按照公式(1)计算。

$$D = (V/T) \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

V ——序列内变异碱基数;

T ——序列碱基总数。

4.2.4 检验时机

引进实验鱼时, 应进行种质检验。

4.3 判定

判定方法如下:



- a) 形态符合要求, 判定为合格;
- b) 形态不可检验时, 进行 DNA 条形码检验, 序列歧异度小于或等于 1.0%, 判定为合格。

5 遗传管理

5.1 应由国家认可或质量评审合格的种源单位引种。

5.2 引种数量和传代方式宜根据实验鱼应用方向确定, 如需保持群体较高遗传杂合度, 引种数量应不少于 25 对, 采用非近亲交配方式繁殖后代。如需保持群体较高遗传纯合度, 引种数量根据需要确定, 采用全同胞兄妹、雌核发育等方式繁殖后代。

5.3 实验鱼引种、传代过程应建立包括种名、来源、数量、雌雄比例、繁殖生产情况等信息的谱系档案。

5.4 传代亲本宜选择 6 月龄 ~ 15 月龄健康成熟个体。

6 微生物和寄生虫监测

6.1 检验指标

实验鱼应排除的微生物和寄生虫指标见表3。

表3 实验鱼应排除的微生物和寄生虫指标

检测指标		实验鱼		
		斑马鱼	剑尾鱼	诸氏鳊虾虎鱼
微生物	致病性嗜水气单胞菌 (<i>Pathogenic Aeromonas hydrophila</i>)	●	●	●
	海分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>)	●		
	迟缓爱德华菌 (<i>Edwardsiella tarda</i>)	○		●
	创伤弧菌 (<i>Vibrio vulnificus</i>)			○
寄生虫	多子小瓜虫 (<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>)	●	●	
	刺激隐核虫 (<i>Cryptocaryon irritans</i>)			●
	微孢子虫 (<i>Pseudoloma neurophilia</i>)	○		
	眼点淀粉卵涡鞭虫 (<i>Amyloodinium ocellatum</i>)			○

注：●表示应检测指标；○表示体色、形态、行为异常时补充的检测指标。

6.2 检验

6.2.1 抽样

6.2.1.1 宜抽取3月龄以上的活鱼。

6.2.1.2 一个鱼缸内随机抽样。包含多个鱼缸的循环水养殖设备,由四角和中央位置的鱼缸内均衡抽样。

6.2.1.3 抽样数量:按抽样单元群体数量的5%抽样,每次抽样不少于5尾,不超过30尾。

6.2.1.4 样品应按要求标识,标签包括样品名称、来源、数量、抽样人和抽样时间等信息。

6.2.2 样品运输

样品应原水运输,温度宜为18℃~24℃,避免污染,宜24h内检测。

6.2.3 寄生虫检验

多子小瓜虫、刺激隐核虫、眼点淀粉卵涡鞭虫取鳃、鳍和体表黏液,水浸片法镜检;微孢子虫取脑或脊髓,压片法镜检。各类寄生虫鉴别特征参见附录B。

6.2.4 微生物检验

样品制备、分离培养和鉴定见附录C。

6.2.5 检验频率

每6个月至少检验1次。

6.3 判定

如某项微生物或寄生虫指标不符合要求,则该抽样单元内的实验鱼群体不合格。

7 饲料

7.1 饲料分类与选择

实验鱼饲料分为配合饲料和生物饵料两类。

不同日龄实验鱼适宜投喂的生物饵料见表 4。

实验鱼也可投喂其他生物饵料。

表 4 不同日龄实验鱼适宜投喂的生物饵料

实验鱼		生物饵料
斑马鱼	5 日龄~15 日龄	草履虫
	≥16 日龄	
剑尾鱼	≥1 日龄	卤虫无节幼体
诸氏辐虾虎鱼	5 日龄~30 日龄	褶皱臂尾轮虫
	≥31 日龄	卤虫无节幼体

7.2 生物饵料的培育与投喂

常用生物饵料的培育与投喂参见附录 D、附录 E 和附录 F。

7.3 质量要求

7.3.1 配合饲料

不应添加抗生素、驱虫剂、防腐剂、色素、促生长剂以及激素等添加剂。

7.3.2 生物饵料

不应携带实验鱼应排除的微生物和寄生虫(见表 3)。

培育用淡水应符合 GB 5749 的规定,且游离氯质量浓度不超过 0.2 mg/L。

培育用海水应符合 NY 5052 的规定。

7.4 生物饵料检验

7.4.1 抽样和检验

随机抽取 30 个~100 个生物饵料,参照附录 B 鉴别各类寄生虫。随机抽取 0.01 g ~0.10 g 鲜重的生物饵料,按照附录 C 的方法检验微生物。

7.4.2 检验频率

每 6 个月至少检验 1 次。

7.5 判定

如某项指标不符合要求,则该批饲料不合格。

8 环境设施

8.1 建筑设施

8.1.1 宜选址在远离有严重空气污染、振动或噪声干扰的区域。

8.1.2 宜配备检疫间、隔离饲养间和洁净储物间。

8.1.3 饲养间顶部、内墙面、门窗和地面应采用不渗透、耐腐蚀、防潮防霉的无毒无味材料,表面应平滑,易于清洁、消毒。

8.1.4 电力负荷应满足需要,宜配备备用电源。

8.1.5 实验鱼实验设施区域宜与生产设施区域分开。

8.2 循环水养殖设备



8.2.1 鱼缸

应符合实验鱼健康和福利要求,无毒、无害、无放射性。

耐腐蚀,易清洗消毒,内表面应圆滑。

应配备缸盖,鱼缸侧壁或顶部应至少局部透明,便于观察。

8.2.2 水处理设备

水处理设备宜包括:

- a) 筛网过滤设备:由尼龙、锦纶、不锈钢等材质制成,筛网孔径以 0.1 mm 为宜;
- b) 蛋白分离和微滤设备:蛋白质分离器、砂滤缸、微滤机等;
- c) 生物处理设备:由珊瑚石、细砂、生化球、陶瓷环或活性炭等滤料构成;
- d) 消毒杀菌设备:紫外或臭氧等杀菌装置。

8.2.3 配套设备

配套设备宜包括:

- a) 供排水设备:包括水泵、供排水管道、水箱和阀门等;
- b) 温控设备:空调或其他调温设备;
- c) 增氧设备:充气泵等;
- d) 水质检测设备:包括温度计、pH 仪、电导率仪和溶解氧仪等;
- e) 供电设备:市政电网、发电机等。

8.3 实验鱼养殖

8.3.1 养殖方式

30 日龄以上的实验鱼宜饲养在循环水养殖设备中(临时配对亲鱼除外)。

8.3.2 养殖密度

参见附录 G。

8.4 安全及防疫要求

8.4.1 循环水养殖设备安全要求和措施应符合 SC/T 6040 的规定。

8.4.2 进入饲养间物品应严格消毒,实验鱼隔离净化合格后才能进入饲养间。

8.4.3 废弃物应及时移出饲养间。

8.4.4 实验室废液应经过处理并达到 GB 8978 要求后排放。

8.5 环境要求

8.5.1 饲养间环境指标

实验鱼饲养间应避免烟、氯、香水等有毒、有刺激性物质进入,其环境指标应符合表 5 的要求。

表 5 实验鱼饲养间环境指标

指标	斑马鱼	剑尾鱼	诸氏辐虾虎鱼
室温/℃	22~32	18~32	20~32
日室温差/℃	≤6.0		
噪声/dB(A)	≤70		
最低工作照度/lx	≥200		
昼夜明暗交替时间/h	14/10		

8.5.2 水源水质

淡水可采用市政自来水或其他水源,水质应符合 GB 5749 的规定,且游离氯的质量浓度不超过 0.2 mg/L;海水可采用天然海水或优质海盐配制,水质应符合 NY 5052 的规定。

8.5.3 养殖水环境指标

30 日龄前的实验鱼水环境溶解氧不低于 3.0 mg/L,实验鱼其他养殖水环境指标应符合表 6 的要求,并应避免急剧变化。

表 6 实验鱼养殖水环境指标

指标	斑马鱼	剑尾鱼	诸氏辐虾虎鱼
水温/℃	24~30	20~30	22~30
日水温差/℃	≤4.0	≤4.0	≤4.0
电导率/(μS/cm)	300~1500	300~1 500	—

表 6 (续)

指标	斑马鱼	剑尾鱼	诸氏鰕虎鱼
pH 值	6.8~7.5	6.8~8.3	7.0~8.5
溶解氧/(mg/L)	≥5.0	≥5.0	≥5.0
盐度/‰	—	—	1.0~3.5
非离子氨/(mg/L) ≤	0.02	0.02	0.04
亚硝酸盐(NO ₂ ⁻)/(mg/L) ≤	0.2	0.2	0.4
水面照度/lx	54~324	54~324	54~324
昼夜明暗交替时间/h	14/10	14/10	14/10
注：“—”表示不作要求。			

8.6 检验

8.6.1 饲养间环境指标检验

按照 GB 14925 的规定执行。

8.6.2 水源水质检验

淡水按照 GB/T 5750 的规定执行(城市集中式供水仅检测游离氯)。海水按照 NY 5052 的规定执行。

8.6.3 养殖水环境指标检验

参见附录 H。

8.6.4 检验频率

饲养间环境指标、养殖水环境指标、淡水和天然海水水质每 6 个月至少检验 1 次。海盐配制的海水每批次检验 1 次(同一批次海盐配制的海水为一个批次)。

原创力文档

附录 A (规范性附录)

实验鱼 DNA 条形码引物及序列

实验鱼 DNA 条形码检测引物及序列分别见表 A.1、表 A.2。

表 A.1 实验鱼 DNA 条形码检测引物

实验鱼	序列(5'-3')
斑马鱼	TCAACTAATCATAAAGACATTGGCAC TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
剑尾鱼	TCAACTAACCATAAAGACATCGGCAC TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
诸氏鲃虎鱼	TCAACTAACCATAAAGACATTGGCAC TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA

表 A.2 实验鱼 DNA 条形码序列

实验鱼	序列(5'-3')	mtDNA 位置
斑马鱼	CCTGTATCTAGTATTTGGTGCTTGAGCCGGAATAGTAGGGACCGCATTAAGCC TCTTAATCCGAGCTGAACTTAGCCAACCAGGAGCACTTCTTGGTGATGATCAA ATCTATAATGTTATTGTTACTGCCCATGCTTTTGTAATAATTTCTTTATAGTAAT ACCCATTCTTATTGGGGGATTTGGAACTGACTTGTGCCACTAATGATTGGGG CCCCGATATGGCATTTCGCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTTCTTCCAC CCTCATTCTTCTTCTATTAGCTTCTTGTGGAGTTGAAGCAGGAGCTGGAACAG GATGAACAGTTTATCCACCTCTTGACAGGCAACCTTGCCCATGCAGGAGCATCT GTTGATCTAACAATTTTTCCTACTAGCTTAGCAGGTGTTTCATCTATTCTTGGAG CAATTAATTTTATTTAGCTACTACAAATTAACATGAAGCCACCAACTATCTCTCAGTAT CAAACCTCCATTATTTGTATGAGCTGTCTTAGTTACAGCTGTACTACTTCTTTTAT CTTTACCAGTGTTAGCTGCCGGAATTACAATACTTCTTACAGACCGAAATCTTAA CACAACGTTCTTTGACCCGGCAGGAGGGGGAGATCCAATTCTTTATCAACACTTATTT	1489-2143
剑尾鱼	CCTTTATCTAGTATTTGGCGCTTGGGCCGGTATGGTGGGAACAGCCTTAAGCC TCTTAATTCGAGCCGAACTAAGTCAACCTGGCACCTCTGGGTGACGACCAAA TCTACAATGTGATCGTCACAGCTCATGCTTTTGTAATAATTTTTTTATAGTCATAC CAATCATAAATTGGCGGCTTTGGTAACTGATTGATCCCACTAATAATCGGCGCTCC CGACATAGCCTTCCCCGAATAAATAACATAAGCTTTGACTCTTCCGCTCTCA TTTCTTCTTCTTCTAGCATCCTCCGGGGTTGAAGCAGGAGCTGGAACCTGGTGA ACTGTTTATCCCCCTCTTGACAGGTAATTTGGCACATGCTGGGCCCTCCGTGGAC TTGACTATTTTTCACTCCACTTGGCTGGTATTTCTCCATTTTAGGGGCAATCAA CTTTATCACCACAATAATTAACATAAAACCCCCGAGCATCTCAATACAGACAC CCCTGTTTGTCTGAGCCGTTCTAATTACAGCCGTACTCCTACTTCTTTCCCTCCCC GTCCTTGCCGCAGGTATTACCATGCTTCTAACAGATCGAAATCTTAACACCACCTT CTTTGACCCCGCAGGTGGGGGAGACCAATCCTCTACCAACACCTATTC	5510-6164

表 A.2 (续)

实验鱼	序列(5'-3')	mtDNA 位置
诸氏鰕 虾虎鱼	CCTTTATCTAGTATTTGGTGCTTGAGCCGGAATAGTGGGCACAGCCCTAAGCCT CCTAATCCGAGCAGAACTAAGCCAGCCTGGTGCGCTACTAGGCGATGATCAGA TCTATAATGTTATTGTAACAGCTCATGCAATTTGTAATAATCTTCTTTATAGTAATAC CAATTATGATTGGAGGCTTTGGAACTGATTAGTCCCCTTAATGATTGGTGCCCC CGATATGGCTTTCCCTCGAATAAACAACATGAGCTTCTGGCTTCTTCCCCCTCT TTCCTTCTCCTGCTTGCCCTCCTCAGGGGTTGAAGCTGGGGCAGGTAAGTTGA ACTGTATACCCCCCTCTCGCAGGCAACCTTGACATGCTGGGGCCTCTGTTGAT CTAACAATCTTTTCACTTCATCTCGCCGGAATCTCCTCCATTTTAGGAGCCATTAA CTTCATTACAACCATCCTAAACATGAAACCTCCTGCTATCTCACAATACCAACACC TCTGTTTGTGTTGGGCAGTGCTGATTACAGCAGTCCTCCTTCTCTTATCCCTACCTG TGCTTGCCGCAGGAATTACCATACTACTCACGGATCGAAATCTAAACACAACCTTC TTTGACCCAGCAGGGGGAGGAGACCAATTCTGTACCAACACTTATTC	5507-6161



附 录 B
(资料性附录)
实验鱼寄生虫的鉴定

B.1 多子小瓜虫

成体卵圆形或球形,大小(0.3 mm~0.8 mm)×(0.3 mm~0.5 mm);体表纤毛分布均匀,前端腹面有一胞口;体内具 U 形或马蹄形核(见图 B.1)。主要寄生于体表和鳃,形成小白点。

B.2 刺激隐核虫

成体呈卵圆形或梨形,长度 0.4 mm 以上;体表分布均匀的纤毛,胞口位于体前端腹面;体内大核分成 4 个卵圆形的串珠状团块(见图 B.2)。主要寄生于体表和鳃,形成小白点。

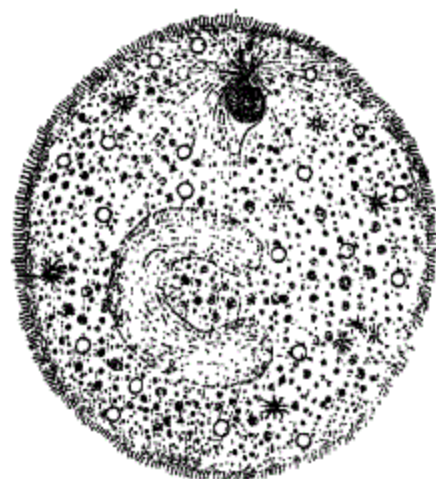


图 B.1 多子小瓜虫(自倪达书等)

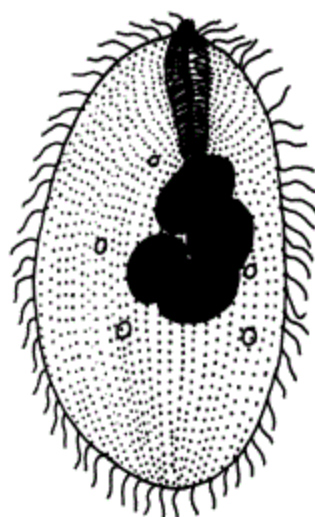


图 B.2 刺激隐核虫(自 Diggles BK)

B.3 眼点淀粉卵涡鞭虫

呈不规则圆形,直径一般为 61.3 μm ~112.7 μm ,虫体一端有假根状突起的附着器(见图 B.3)。主要寄生于体表和鳃,形成浅灰色团块。

B.4 微孢子虫

呈卵形或梨形,孢子大小(3 μm ~5 μm)×(4 μm ~5 μm);后端有一突出的液泡(见图 B.4)。主要寄生于脑、脊髓组织;严重感染时,鱼体消瘦,脊椎弯曲。



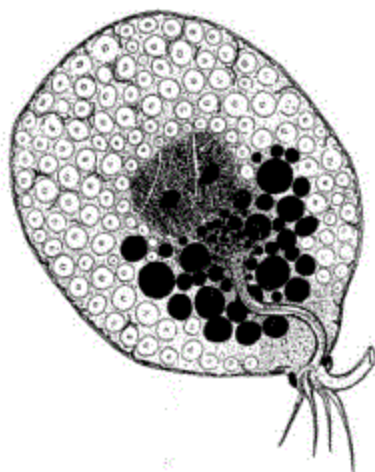


图 B.3 眼点淀粉卵涡鞭虫(自 Brown M 等)

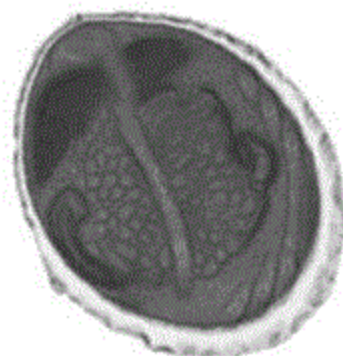


图 B.4 微孢子虫(自 Cali A 等)

附 录 C

(规范性附录)

实验鱼微生物分离、培养及鉴定

C.1 致病性嗜水气单胞菌

C.1.1 样品制备

C.1.1.1 实验鱼

无菌操作取肝组织。

C.1.1.2 生物饵料

无菌生理盐水冲洗 3 次,匀浆。

C.1.2 分离培养

将样品划线接种于普通琼脂平板,28℃±1℃培养 22 h~24 h,挑选可疑菌落划线接种于普通琼脂平板,28℃±1℃培养 22 h~24 h。

C.1.3 鉴定

按照 GB/T 18652 的规定执行,也可采用生化鉴定试剂盒鉴定。

C.2 迟缓爱德华菌

C.2.1 样品制备

按照 C.1.1 方法执行。

C.2.2 分离培养

将样品划线接种于血琼脂平板,28℃±1℃培养 24 h~48 h,挑选可疑菌落划线接种于脑心浸液琼脂培养基中(BHI),28℃±1℃培养 24 h~48 h。

C.2.3 鉴定

按照 SC/T 7214.1 的规定执行,也可采用生化鉴定试剂盒鉴定。

C.3 创伤弧菌

C.3.1 样品制备

按照 C.1.1 方法执行。

C.3.2 分离培养

将样品划线接种于 TCBS 琼脂平板,28℃±1℃培养 20 h~24 h,挑选绿色可疑菌落划线接种于

TCBS 琼脂平板, 28 ℃ ± 1 ℃ 培养 24 h。

C.3.3 鉴定

采用生化鉴定试剂盒鉴定。

C.4 海分枝杆菌

C.4.1 样品制备

C.4.1.1 实验鱼

无菌操作取肝、肾组织。

C.4.1.2 生物饵料

无菌生理盐水冲洗 3 次, 匀浆。

C.4.2 分离培养

将样品划线接种于罗氏培养基, 28 ℃ ~ 32 ℃ 恒温培养 15 d ~ 30 d。

C.4.3 初步鉴定

出现粗糙、黄色或灰白色(避光培养)凸起的菌落, 且菌落涂片、抗酸染色镜检呈红色。

C.4.4 PCR 鉴定

C.4.4.1 基因组 DNA 的提取

按照 GB/T 19495.3 的方法或采用具有相同效果的细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

C.4.4.2 PCR 扩增

对样品进行 PCR 扩增, 其中海分枝杆菌 ATCC 927 株 DNA 为阳性对照, 大肠杆菌 ATCC 25922 株 DNA 为阴性对照, 双蒸水为空白对照。PCR 扩增引物序列为 F: 5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3', R: 5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3'。PCR 总反应体积为 50 μL, 其中含 10× PCR 缓冲液 5 μL, dNTP(含 dCTP、dATP、dGTP、dTTP 各 2.5 mmol/L) 4 μL, 上下游引物各 2 μL(终浓度为 0.2 μmol/L ~ 1.0 μmol/L), 基因组 DNA 2 μL(总量 100 ng ~ 1 000 ng), Taq 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 双蒸水补齐至 50 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 变性 30 s, 62 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

C.4.4.3 电泳

琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

C.4.4.4 PCR 扩增结果有效性确认

阳性对照的 PCR 扩增产物电泳出现 644 bp 条带, 且阴性和空白对照不出现该条带, 则 PCR 扩增结果有效。

C.4.4.5 序列测定

样品 PCR 扩增产物若出现 644 bp 的条带, 回收纯化该条带, 双向测序。

C.4.4.6 序列分析

采用 BLAST 程序,将测序结果与 GenBank 中海分枝杆菌 ATCC 927 株 *Hsp65* 基因序列 (GenBank 登录号: AF456470.1)进行相似性分析。

C.4.5 判定

初步鉴定结果符合 C.4.3,且 PCR 扩增序列与海分枝杆菌(ATCC 927) *Hsp65* 基因序列相似性 99%以上判定为海分枝杆菌。



附 录 D
(资料性附录)
草履虫培育与投喂

D.1 种名

大草履虫(*Paramecium caudatum*),又名尾草履虫。

D.2 草履虫引种时的纯化

将含有草履虫的液体吸入表面皿(或凹玻片)中,在显微镜或解剖镜下检查,用直径约 0.2 mm 的微吸管将表面皿(或凹玻片)中的草履虫逐个吸出(必要时用超纯水或去离子水反复稀释、冲洗)培养。

D.3 草履虫的培养

将纯培养的草履虫倒入至 500 mL 或 1 000 mL 烧杯中,加适量除氯的自来水,每天滴加 1 滴~2 滴新鲜配制浓度为 0.9 g/L~3.0 g/L 的酵母原液,在水温 22 ℃~28 ℃、pH 值 6.5~7.5 的条件下培养。培养过程尽量保持环境因子恒定。

D.4 草履虫的收集投喂

收集培养液表面的草履虫,用养殖水冲洗(必要时用孔径为 0.03 mm~0.05 mm 的筛绢网收集)后投喂,投喂量以保持每毫升水体中 4 个草履虫的密度为宜。



附 录 E

(资料性附录)

褶皱臂尾轮虫培育与投喂

E.1 种名

褶皱臂尾轮虫(*Brachionus plicatilis*)。

E.2 褶皱臂尾轮虫的纯化

将含有褶皱臂尾轮虫的液体吸入表面皿(或凹玻片)中,在显微镜或解剖镜下检查,用直径约 0.5 mm 的微吸管将表面皿(或凹玻片)中的褶皱臂尾轮虫逐个吸出(必要时用灭菌海水反复稀释、冲洗)培养。

E.3 褶皱臂尾轮虫的培养



培养用水应经砂滤、孔径为 0.05 mm 的筛绢网过滤或其他方式处理以除去小型甲壳动物等敌害生物。

盐度 15~25、pH 值 7.5~8.5、温度 25℃~30℃、溶氧 2.0 mg/L 以上、非离子氨 1.0 mg/L 以下,光照强度 500 lx 左右或自然光照。

轮虫接种密度宜为每毫升 5 个~10 个。

宜采用海水小球藻培养,藻类密度宜为每毫升 2.0×10^6 个,如以酵母培养,投喂鱼苗前应采用海水小球藻强化 24 h 以上。

连续微量充气。

经常检查轮虫的生长情况,轮虫生长良好时个体肥大、肠胃饱满、游动活泼、体表洁净、多数虫体带有夏卵;轮虫死壳多,身体上附着污物,沉底、不活泼、不带卵或带冬卵为不良情况,应改进培养方法。

E.4 褶皱臂尾轮虫的投喂

投喂前用孔径为 0.05 mm 的筛绢网收集轮虫、孔径为 0.3 mm 的筛绢网滤除藻渣等杂质,投喂量以保持水体中的轮虫密度约为每毫升 10 个~20 个为宜。

附 录 F
(资料性附录)
卤虫孵化与投喂

F.1 卤虫卵的质量要求

卤虫卵孵化率大于或等于 80%，含水率小于或等于 8.0%，杂质小于或等于 1.0%，检验方法按照 SN/T 0476 的规定执行。

运输过程中应防止包装破损、日晒、雨淋。

卤虫卵应在低温、干燥、避光、密封条件下贮存，严禁与有毒、有害物品混合存放。

开罐后卤虫卵应尽快使用。

F.2 卤虫卵孵化

孵化前用 2%~3% 的福尔马林浸泡 10 min~15 min 或次氯酸钠(有效氯大于或等于 20 mg/L)溶液浸泡 30 min，清水冲洗后孵化。也可采取其他消毒方法。

孵化密度不宜超过 3.0 g/L。

卤虫孵化环境因子宜为：水温 25℃~30℃、盐度 10~30、pH 值 7.5~8.2，光照 1 000 lx~3 000 lx，溶解氧大于 5.0 mg/L。

持续微量充气，使卤虫卵处于悬浮状态。

F.3 卤虫的投喂

投喂前去除空壳和未孵化的卤虫卵，用孔径为 0.1 mm 的筛绢网收集、冲洗卤虫无节幼体。

幼体孵出后 24 h 内投喂，也可投喂经清洗的脱壳卤虫卵。

投喂量以 5 min~10 min 吃完为宜，每天投喂 2 次。

附 录 G
(资料性附录)
实验鱼饲养密度

实验鱼饲养密度见表 G.1。

表 G.1 实验鱼饲养密度

实验鱼		饲养密度 尾/L ≤
斑马鱼	5 日龄~15 日龄	50
	16 日龄~30 日龄	25
	31 日龄~90 日龄	8
	>90 日龄	5
剑尾鱼	1 日龄~30 日龄	5
	31 日龄~120 日龄	3
	>120 日龄	1
诸氏鰕虎鱼	5 日龄~15 日龄	50
	16 日龄~30 日龄	30
	31 日龄~120 日龄	10
	>120 日龄	3



附 录 H
(资料性附录)
实验鱼环境指标检测方法

实验鱼环境指标检测方法见表 H.1。

表 H.1 环境指标检测方法

指标	检测方法
水温	GB/T 13195
电导率	GB/T 5750
pH 值	GB/T 5750(淡水),GB 17378.4(海水)
溶解氧	HJ 506
盐度	GB 17378.4
非离子氨	GB/T 5750(淡水),GB 17378.4(海水)
亚硝酸盐	GB/T 5750(淡水),GB 17378.4(海水)
噪声	GB 14925
水面照度	GB 14925
昼夜明暗交替时间	GB 14925

参 考 文 献

- [1] GB/T 13195 水质 水温的测定 温度计或颠倒温度计测定法
 - [2] GB 17378.4 海洋监测规范 第4部分:海水分析
 - [3] HJ 506 水质 溶解氧的测定 电化学探头法
 - [4] SN/T 0476 进出口卤虫卵检验方法
-

