

草履虫培养及富集浓缩的方法

草履虫是一种常见的单细胞生物，具有个体大、易培养、繁殖速度快等特征，是理想的斑马鱼幼鱼开口饵料。国家斑马鱼资源中心（CZRC），在斑马鱼幼鱼期间 5 ~ 15 dpf（days post fertilization），选择草履虫作为主要饵料，幼鱼的存活率可达 90% 以上。CZRC 拥有优质的草履虫种源（中心提供种源为 > 500 个/mL），可对外提供服务（<http://www.zfish.cn/Products/ProductDetail.aspx?CZRCID=Pr1>），下面将简单的介绍 CZRC 草履虫培养及富集浓缩的方法。

1. 材料

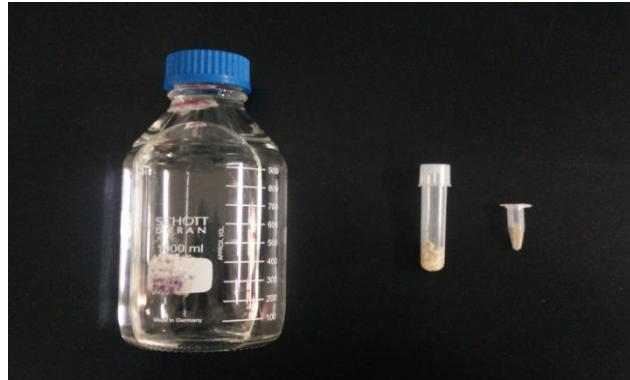
酵母粉（片）、小麦粒、 NaHCO_3 、葡萄糖、纯水、无菌培养瓶（160 mL）、玻璃平皿（直径 150 mm）、灭菌管（12 mL）、过滤筛（120、500 和 1250 目）。

2. 操作步骤

2.1 草履虫种源的培养

2.1.1 培养液配制

- 1、在 1 L 纯水中加入 0.20 g NaHCO_3 后，湿热灭菌。
- 2、称取 0.25 g 酵母粉放入 1.5 mL 离心管中密封，干热灭菌。
- 3、将 10 ~ 15 枚小麦粒放入灭菌管（见附图 1）中，同时加入少量纯水浸没麦粒，湿热灭菌。
- 4、待上述灭菌结束后，静置至室温，在无菌操作台中，将灭菌酵母加入含 NaHCO_3 的灭菌水中混匀。即配制成 0.25 g/L 酵母培养液。



附图 1

2.1.2 草履虫接种

1、在无菌操作台中，将酵母培养液按每瓶 120 mL 分装到无菌培养瓶（见附图 2）中，同时在每一个培养瓶中加入 1 ~ 2 粒灭菌过的小麦粒。

2、将事先准备好的草履虫种源（可在 CZRC 购买），接种 10 ~ 20 mL 到培养瓶中，确保草履虫密度不低于 25 个/mL（密度统计方法见 2.4）。将接种好的培养瓶放入恒温培养箱中，15℃ 长期培养（1 ~ 3 个月）。

3、需要种源时，将草履虫培养瓶从 15℃ 培养箱中拿出，按照 1:1 接入新鲜灭菌培养液，并放置 28℃ 恒温培养箱中培养 3 ~ 7 天。

4、选择草履虫密度高（> 1000 个/mL）、运动快、生命力旺盛的培养瓶作为种源。



附图 2

2.2 草履虫高密度培养

2.2.1 培养液配制

在 1 L 纯水中分别加入 0.25 g 碳酸氢钠、0.2 g 葡萄糖、0.5 g 酵母粉后密封，70℃烘箱中烘 2 ~ 3 h 后放置室温待用，培养液 pH 范围为 7.0 ~ 7.5。

2.2.2 草履虫接种

1、将草履虫种源，按照 1:2 的比例接种，即 100 mL 草履虫种源接种到装有 200 mL 新鲜培养液的玻璃平皿（见附图 3）中。

2、将平皿放置 28℃恒温培养箱中培养 3 ~ 7 天，每日统计平皿中草履虫的密度。最高密度可达 2000 个/mL。

3、培养过程中若培养液由浑浊变清，且密度较低时，可适量的补充新鲜酵母浓度较高的培养液。密度达到 2000 个/mL 左右时，可以按照 2.3 进行富集浓缩，或重复上述步骤 1 接种。此时，草履虫属于开放培养存在污染其它单细胞生物的可能，所以不能作为种源。

4、将培养温度提高到 30 ~ 35℃范围内，可加快草履虫的繁殖速度。另外，在平皿中加入 1 ~ 2 枚灭菌过的小麦粒可以提高草履虫密度。



附图 3

2.3 草履虫的富集浓缩

统计草履虫的密度，当密度 > 2000 个/mL 时，可进行富集浓缩。富集步骤如下：

- 1、用 120 目的过滤网过滤培养液，此时大部分草履虫都在过滤液中，收集过滤液。

- 2、将收集的过滤液倒入 500 目过滤网中进行过滤，收集过滤液。此时滤速较慢，可以轻轻地震荡过滤筛，加速滤过速度。

- 3、将收集的过滤液倒入 1250 目过滤网过滤，此时，草履虫富集在过滤筛上，弃掉过滤液。用适量纯水轻轻冲洗过滤筛，并收集过滤筛上的草履虫，可重复冲洗 2 ~ 3 次得到干净的草履虫溶液。确定富集草履虫的密度，按照投喂后养殖水中草履虫密度大于 100 个/mL 进行投喂。

2.4 草履虫密度统计方法

将待计数的草履虫培养液摇匀后，用移液枪取 20 μL 的草履虫培养液滴于载玻片上，在解剖镜下拍照计数，重复取样计数 3 次。当镜下视野中草履虫数目超过 20 个时，在载玻片上滴 1 滴 0.1% 冰醋酸杀死草履虫后拍照计数。