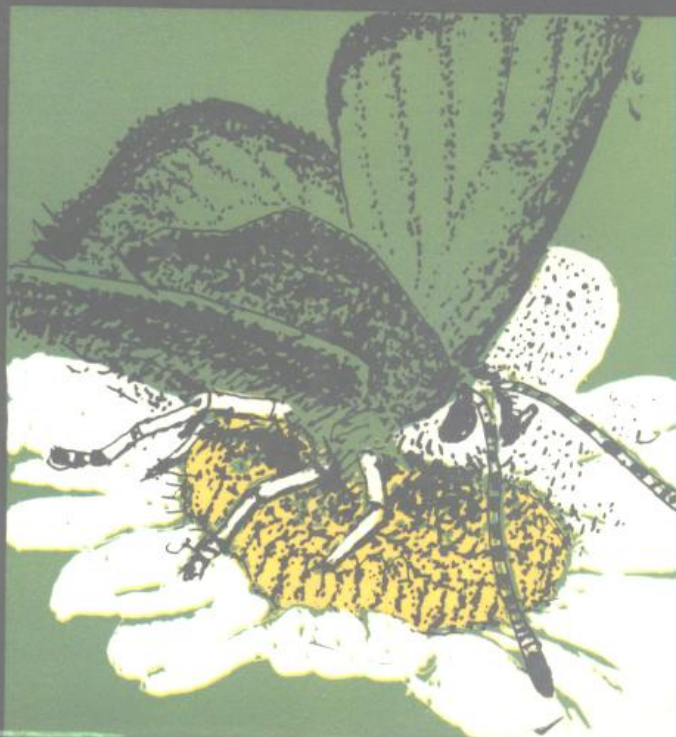


陈守同
刘安西
编著

昆虫电生理学 实验研究法



科学出版社



昆虫电生理学 实验研究法

刘安西 陈守同 编著

科学出版社

1990

内 容 简 介

本书是国内第一本系统介绍昆虫电生理实验研究技术的指导书，它反映了当前在这个领域中国内外的最新进展。初学者阅读之后就能应用。全书共分八章，收入13个实验，包括昆虫神经动作电位、突触电位、神经肌肉接点电位、触角电位、味觉电位、轴突膜电流 (Na^+ , K^+)、谷氨酸单离子通道电流等。本书偏重实验方法和应用前景的介绍，并且编入昆虫电生理常用仪器选择、抗干扰、防震实验台设置等，供建立或改建电生理实验室参考。

本书对大专院校生物系师生、农、林、水产、医学、植物保护、环境保护等专业师生和科研、生产单位、生物-物理学部分学科的工作人员及其爱好者，都有广泛的参考价值。

昆虫电生理学实验研究法

刘安西 陈守同 编著

责任编辑 王惠穆

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100707

北京景山学校印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1990年2月 第一版 开本：787×1092 1/32

1990年2月第一次印刷 印张：5 7/8

印数：0001—2 340 字数：130 000

ISBN 7-03-001524-X/Q·222

定价：5.50元

前 言

现代科学的重大成果，多数是基于研究方法和实验技术新的突破。随着神经生理、生物物理和分子生物学等学科现代理论和新技术的应用，促使昆虫电生理学有了很大的发展。但迄今为止尚未有一本较系统地介绍昆虫电生理实验研究方法的读物。为此，我们编写此书，想以较短的篇幅介绍昆虫神经、肌肉、感觉器官等主要领域电生理实验技术和研究方法。本书原系“昆虫电生理技术”讲稿，供动物学专业大学生、研究生使用，后经增补编辑而成。本书在写法上着重于实验方法和技术的描写，注意经验与体会的介绍，力求使初学者阅读之后就能应用。同时力求反映这些领域中当前国内外的最新进展。如，80年代初发展起来的膜片钳(patch clamp)方法在技术上有了新的突破，为从分子水平了解生物膜离子单通道药理、毒理信息，提供了重要手段。这意味着人们对生物膜离子通道药理、毒理研究，已从宏观深入到微观水平。目前它正以惊人的速度渗透到许多学科，其中包括昆虫电生理学。近年关于谷氨酸通道的认识多来源于昆虫肌肉细胞实验。此外还介绍了记录昆虫神经膜电流的油间隙、单纤维、电压钳位法；双微电极电压钳位法和连续动态检测细胞内 K^+ 、 Na^+ 活度的离子选择微电极法等。

本书共分八章，包括昆虫器官和组织标本的制备、常用电生理仪器及13个实验。实验方法由浅入深，先易后难；从细胞外记录到细胞内记录；由诱发电位、膜电流引导到单离子通道电流记录，并且结合药物、杀虫剂毒理机制描述，使读者了解不同方法的应用前景。附录中叙述了电生理仪器的干扰源及抑制方法，如，基线漂移、仪器噪声和实验台的防震措施

等,为抗干扰提供参考。

编著者谨向审阅本书初稿并提出宝贵意见的龚坤元研究员、张宗炳教授、管致和教授、孙耘芹副研究员、尚稚珍教授致谢;向本书中引用其著述的中、外作者致谢。

由于我们水平有限,特别是新技术新方法涉及学科很多,书中定有不少错误和不妥之处,请读者和各方面专家批评指正。

刘安西

1988年11月于南开大学

目 录

第一章 昆虫电生理常用实验材料——昆虫器官和组织标本制备.....	(1)
第一节 神经标本制备.....	(1)
一、美洲蜚蠊或黑胸大蠊中枢神经离体标本制备	(1)
二、美洲蜚蠊或黑胸大蠊中枢神经单纤维大轴突离体标本制备	(1)
第二节 神经-肌肉标本制备	(2)
一、果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)幼虫运动神经-腹纵肌标本制备	(2)
二、飞蝗后足胫节伸肌标本制备	(5)
第三节 器官标本.....	(5)
一、美洲蜚蠊腹部去神经半离体心室标本制备	(5)
二、亚洲玉米螟幼虫化学感受器(栓锥感受器)标本制备	(7)
第二章 昆虫电生理学常用仪器设备.....	(9)
第一节 昆虫电生理学常用实验仪器.....	(9)
一、生物电放大器	(9)
二、电子刺激器	(13)
三、刺激隔离器	(15)
四、阴极射线示波器和数字存贮示波器	(15)
第二节 微操纵器.....	(18)
第三节 微型电子计算机及其应用.....	(19)
第三章 神经肌肉实验.....	(22)
实验一 昆虫中枢神经动作电位(AP)的引导和传导速度的测定(细胞外记录)	(22)

实验二	昆虫中枢神经兴奋性和抑制性突触后电位(EPSP, IPSP)的引导(蔗糖间隙法)和毒理学研究中的应用.....	(26)
实验三	昆虫神经-肌肉突触电反应——兴奋性接点电位(EJPS)和L-谷氨酸电位的引导(细胞内记录和离子电泳法).....	(38)
实验四	昆虫轴突内外钾离子活度的动态检测(离子选择微电极法).....	(46)
实验五	果蝇(<i>Drosophila melanogaster</i>)幼虫腹纵肌细胞两种钾电流 I_A 、 I_K 的引导和遗传学研究中的应用(双微电极电压钳位法 voltage clamp) (三).....	(58)
实验六	飞蝗(<i>Locusta migratoria</i>)肌细胞谷氨酸单通道电流的引导(膜片钳法 patch clamp).....	(68)
第四章	循环实验.....	(85)
实验七	昆虫心搏电位的引导(热敏电阻换能器法).....	(85)
第五章	感觉器官实验.....	(92)
实验八	昆虫嗅觉感受器电反应——触角电位图(EAG)和性信息素研究中的应用(一).....	(92)
实验九	昆虫触角电位图(EAG)和气相色谱(GC)仪联机检测性信息素的生物活性(GC-EAD法)(二).....	(99)
实验十	昆虫味觉感受器电位和拒食效应.....	(106)
第六章	中枢神经实验.....	(113)
实验十一	昆虫中枢神经大轴突膜电流(I_{Na} , I_K)的引	

导(油间隙、单纤维、电压钳位法) (oil-gap, single-sibre, voltage clamp method) (一) ...	(113)
实验十二 氯氰菊酯异构体对昆虫中枢神经大轴突钠、钾离子通道的作用(二)	(125)
第七章 电子计算机应用举例.....	(136)
实验十三 袖珍电子计算机(PC-1500) 在昆虫电生理数据处理中的应用——神经膜电流-电压(I-V)关系曲线的绘制和软件(四)	(136)
第八章 附 录.....	(155)
第一节 几种昆虫生理代用液和常用药品的配制	(155)
一、生理代用液.....	(155)
二、几种常用药品的配制.....	(157)
第二节 昆虫电生理检测中的干扰及抑制.....	(158)
一、干扰的来源	(159)
二、仪器使用中接地不当引起的干扰	(162)
三、仪器噪声	(164)
四、基线漂移	(165)
第三节 几种测量微电极的制作.....	(166)
一、银-氯化银电极.....	(167)
二、吸引电极.....	(170)
三、玻璃微电极	(172)
第四节 实验台的振动控制.....	(176)
第五节 电生理实验常用昆虫的室内饲养.....	(178)
一、果蝇幼虫饲养	(178)
二、亚洲玉米螟幼虫饲养	(179)
三、美洲蜚蠊(或黑胸大蠊)的饲养	(179)

第一章 昆虫电生理常用实验材料

——昆虫器官和组织标本制备

第一节 神经标本制备

一、美洲蜚蠊或黑胸大蠊中枢神经离体标本制备

以室内饲养（温度28℃）体长约30mm的美洲蜚蠊（*P. ripplaneta americana*）或黑胸大蠊（*P. fulginosa*，又称烟色大蠊）雄性成虫为材料。选取健壮、活跃个体，剪掉足翅。虫体背面向上，用大头针固定于蜡盘中央，沿背中中线剪开体壁，细心去掉背板、消化道、气管、脂肪体。露出腹神经索，细心剥离出包括尾须神经在内的整条神经索，腹部有6个神经节（图1-1a）。第6腹神经节是尾须感觉神经元进入中枢神经元的突触所在连接点。蜚蠊尾须神经由第X、XI两条神经组成，分别具有抑制和兴奋的功能。

二、美洲蜚蠊或黑胸大蠊中枢神经 单纤维大轴突离体标本制备

同上法，先制备离体腹神经索，然后将其置于滴有生理溶液的载玻片上，在高倍双目镜下，找到第6和5腹神经节，将节间腹神经索的两股神经分开，再将其中一股神经外面的结缔组织神经鞘剥离，用玻璃针小心分离出中间神经元大轴突2（giant interneurone 2），简称GI₂，直径约40—50μm。剪断其余神经纤维。单纤维GI₂是引导单个EPSP电位和油间隙、电压钳位等实验的材料（图1-1b, c）。剥离GI₂难度较大，注意

勿损伤神经纤维。

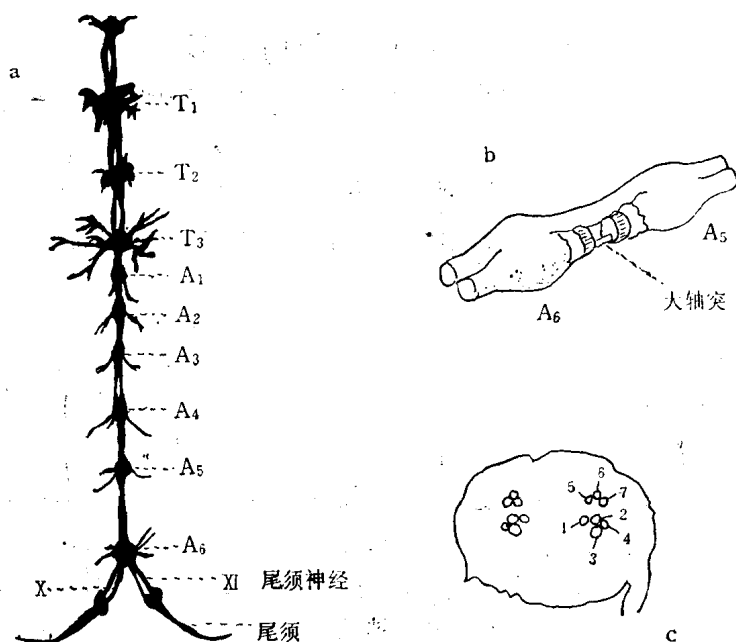


图 1-1 黑胸大蠊离体中枢神经系统

- a. 离体腹神经索, $T_1—T_3$ 胸神经节, $A_1—A_6$ 腹神经节;
 b. $A_5—A_6$ 腹神经节间已剥离的单根中间神经元大轴突;
 c. $A_5—A_6$ 节间横切面示大轴突位置。分别称 $GI_1, GI_2, GI_3, \dots, GI_7$ 。(仿 Harro, 1980)

第二节 神经-肌肉标本制备

一、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)

幼虫运动神经-腹纵肌标本制备

以室内饲养正常型果蝇(wild-type canton-S, 简称CS) 3 龄幼虫为材料。虫体长 3—4 mm。背面向上置于特制的小

型解剖皿内,它是由长7.5cm,宽5cm的玻璃片和同样大小的磁性硅橡皮,用树脂粘结而成。硅橡皮中间有一直径为3.5cm的圆孔,可放入虫体并注入Ringer生理溶液。磁性橡皮上吸附有6根用昆虫针改制成的钩,作为固定和拉开幼虫体壁之用,向圆孔的一端是弯曲的钩状,另一端吸附于磁性橡皮上(图1-2a)。

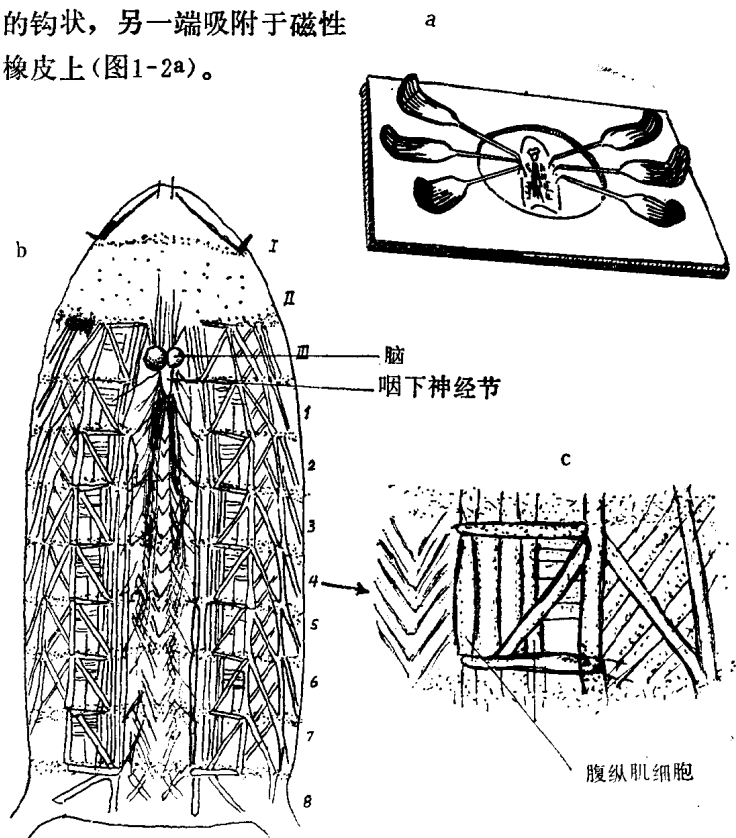


图 1-2 果蝇幼虫解剖

- a. 解剖皿,示吸附于磁性橡皮上的6个小钩;
- b. 内部解剖,示脑、咽下神经节和肌肉, I, II, III为胸节, 1, 2, …… 8为腹节;
- c. 第IV腹节一侧放大, 示4个腹纵肌细胞。(仿Jan.L.Y.,1976)

用小号医用止血钳,从剃须刀片的刀刃上,拆下具锐利尖端的一小片,用此小片的锋利刀尖,沿幼虫背中线自后向前划

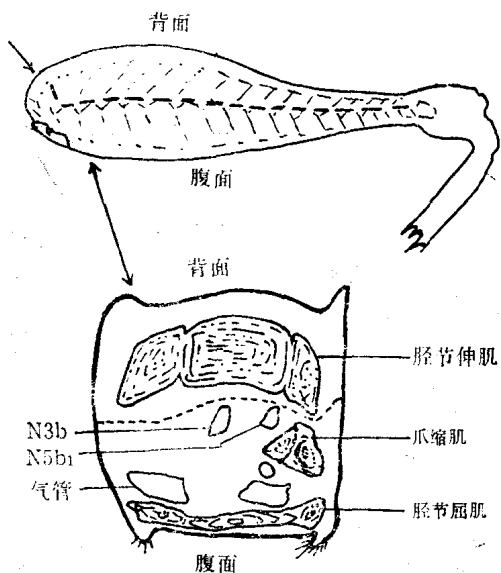


图 1-3 飞蝗后足股节解剖图

上图为飞蝗右后足股节内侧面。自箭头指示处横切。

下图为股节基部横切面,示胫节伸肌、屈肌、气管、神经分支(N3b、N5b₁)等。(仿Miller,1979)

开体壁。用上述昆虫针改制的小钩拉开，去掉消化道和一些内脏器官、腺体等，露出虫体前端的脑和咽下神经节及由其发出的许多条运动神经。后者分别控制着虫体相应体节的肌肉细胞。果蝇幼虫体壁约有400条肌肉细胞，各体节按固定图式排列。腹中线外侧为斜肌，斜肌之外侧为腹纵肌细胞，每体节有8个(左右各4个)，均为单细胞(图1-2b, c)，长约400 μm ，宽80 μm ，厚25 μm 左右。这些细胞，包括控制该体节一侧的运动神经和腹纵肌细胞的神经-肌肉接头，是研究离子通道和离子电流的好材料。

二、飞蝗后足胫节伸肌标本制备

将东亚飞蝗右后足(跳跃足)取下，用小剪刀自股节背面前外侧向内侧剪开几丁质外骨骼，再自基部向股节端部纵行剪开。用镊子小心剥离背面的几丁质外骨骼，下面即为胫节伸肌(extensor tibiae muscle)。中间右侧小块肌肉为爪缩肌，其下腹面肌肉为胫节屈肌(图1-3)。肌肉间有神经和气管。剥离好的胫节伸肌与股节一起置于生理盐水中，做为实验材料备用。



第三节 器官标

北林图 A00109156

一、美洲蜚蠊腹部去神经半离体心室标本制备

以室内饲养的美洲蜚蠊(或黑胸大蠊)雄性成虫为材料。剪掉足和翅。背部朝下固定于蜡盘上，用小剪刀自虫体两侧气门上方剪开体壁，细心去掉腹板、消化道和脂肪体。在背板与背膈之间，背中线位置有一纵行细管为背血管。昆虫腹部的背血管即心脏。滴加生理溶液，防止标本干燥且使细微组

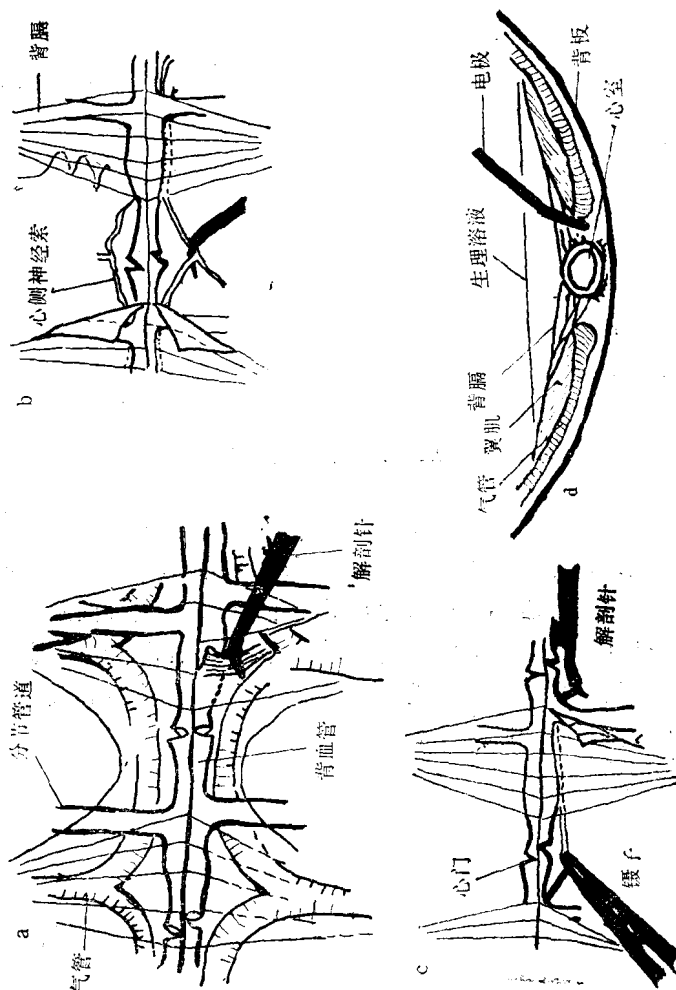


图 1-4 蛱蝶腹部心脏解剖示意图

- a. 腹部第Ⅲ、Ⅳ节心室位置；b. 心室两侧的心侧神经索；c. 去掉心侧神经；d. 已制备的心室标本，示电极位置。

(仿Miller, 1979)

织漂浮其间,便于观察和解剖。在高倍双目镜下找到第Ⅲ、第Ⅳ腹节,其背血管两侧各有一条纵行的粗大气管,靠近背血管处呈“Y”形分支,背血管外围有纵行分节的管道(segmental vessels)及背膈。用探针插入“Y”形气管分叉处,第Ⅳ心室心门之后,小心剥离背膈、气管(图1-4a)。紧贴背血管两侧各有一条细而半透明的心侧神经索(lateral cardiac nerve cord),它与腹神经节相连,因其与心搏速度(心搏率)、肠道、马氏管和产卵管的蠕动有关,为了避免其他因素对心搏的影响,应剪掉两侧的心侧神经(图1-4b, c),并剥离组织膜,即可露出膨大的第Ⅳ心室和一对心门。同法,可剥离其他第Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ腹节心室。然后自腹部第Ⅰ节剪下背板,置于灌流室待用。因心室管壁很薄且半透明,故剥离外围组织膜的难度较大,操作时,勿碰伤心室。否则影响实验结果。

二、亚洲玉米螟幼虫化学感受器 (栓锥感受器)标本制备

取亚洲玉米螟5龄幼虫,剪下头部。用小镊子从头部两侧伸入破坏其肌肉,并轻压下唇基部,使下颚伸展开。将此离体头部置于小培养皿(3cm)内,加少量生理盐水,防止瘤状体上的感受器干燥,影响电位记录。将小培养皿置于双目镜下观察离体头部的腹面(图1-5),其外部化学感受器主要有:

- ①在上颚外侧的触角上,生长数条长短不一的感觉毛,为昆虫的嗅觉器官,嗅觉感受器集中于触角上。
- ②在下唇两侧的下颚上,具下颚须和瘤状体。下颚须位于外侧,瘤状体位于内侧。
- ③在瘤状体上,靠近下颚须的称侧栓锥感受器(lateral sensillum styloconicum),靠近下唇的称中栓锥感受器(medial sensillum styloconicum)。这就是引导味觉感受器电位的实

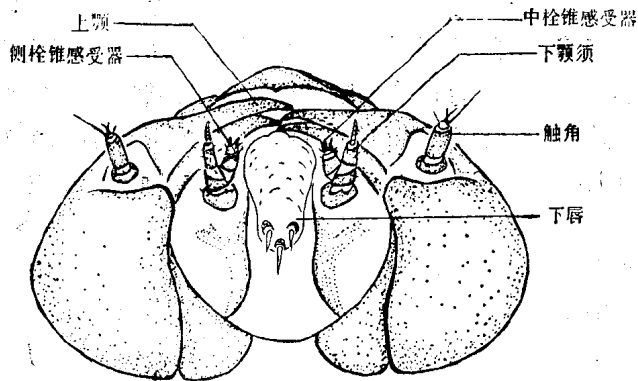


图 1-5 亚洲玉米螟幼虫头部腹面观(仿赵文柱,1988)

验材料。在扫描电镜下,下颚须顶端有8个小突起,称栓锥感受器(sensilla basiconica)为嗅觉器官。其中3个突起顶端较钝,大小相近。其余5个突起,顶端较尖,基部膨大。侧栓锥感受器和中栓锥感受器在扫描电镜下的外部形态无甚差异。二者侧壁光滑无孔,顶端为一锥形体结构,具一小孔,为接受化学物质的孔道。

第二章 昆虫电生理学常用仪器设备

第一节 昆虫电生理学常用实验仪器

生物电现象存在于一切生命活动之中。昆虫电生理学是以电子仪器为工具研究昆虫机体活动时所产生的电现象,以深入研究和阐明生命活动规律。

由于昆虫个体小,电变化很微弱,通常仅为微伏(μV)级或毫伏(mV)级。因此要观察和记录这种变化,必须将其放大才能在示波器或记录仪器上显示。研究昆虫细胞、组织的电活动,需要通过刺激来诱发。电刺激是较为适宜与常用的方法。研究昆虫电反应的基本仪器,包括:生物电放大器、电子刺激器和阴极射线示波器。近10年来,随着微型和袖珍电子计算机的广泛应用,改变了传统电生理仪器设备结构状况。通过模-数转换器将放大后的生物电信号显示于监视器上,存贮于软盘或普通录音机磁带上。也可用打印机,打印文字或绘图,同时可以进行数据处理和数值计算。因此微型计算机系统已成为现代电生理学中不可缺少的有用工具。新概念电生理仪器(即生物电放大器、微操纵器、显微镜和微机系统)价格约为传统设备的三分之一至二分之一,比较经济。几种常用仪器,要求使用者在实验前先了解这些仪器的基本性能、特点和注意事项。通过实验,学会使用方法,掌握操作要点。

一、生物电放大器

生物电放大器又称前置放大器,简称“前放”,用以放大生物电信号。由于昆虫个体小、电位非常微弱、且变化迅速,机