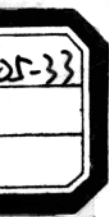
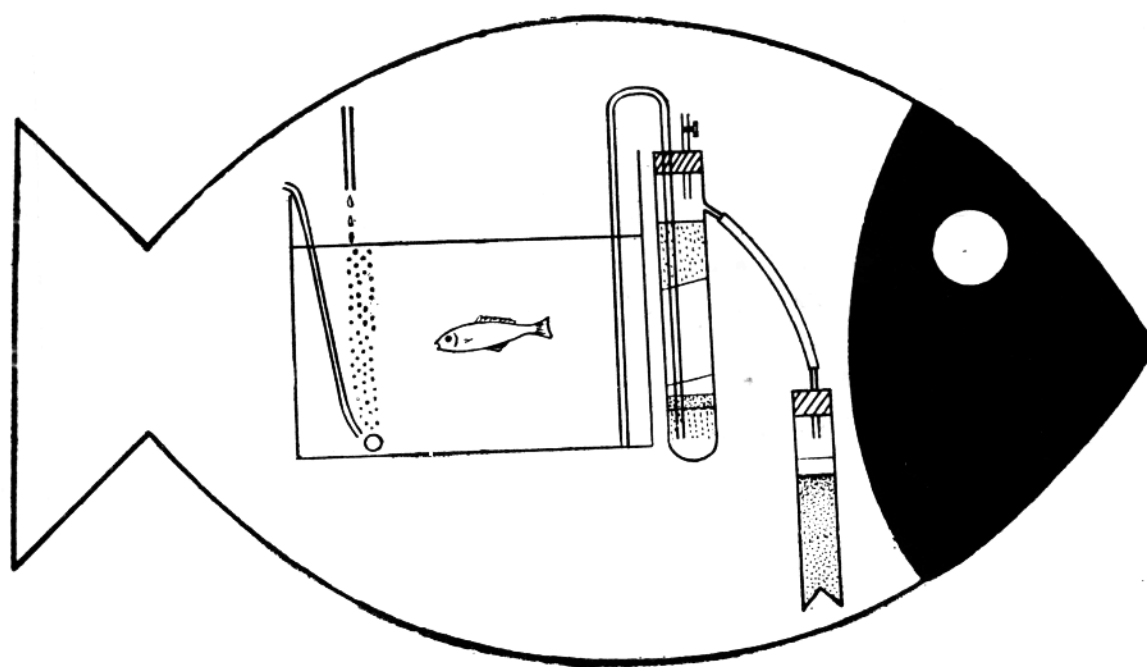


鱼类生理学实验技术和方法

林浩然 彭 纯 梁坚勇 张梅丽 编著



中 山 大 学

厦门水产学院
图书馆资料室

序 言

目前，一些综合性大学的动物学专业、水产院校和农学院的水产，养殖专业中都开设了鱼类生理学的课程。但至今还没有一本鱼类生理学的教材和实验指导公开出版发行。我们从1982年以来，在动物学专业鱼类学选课组的学生中开设了鱼类生理学课程及实验，编写了“鱼类生理学”和“鱼类生理学实验指导”的讲义，并根据教学实践情况先后两次进行修改、完善和补充。

为了进一步满足教学和科学研究的需要，我们在“鱼类生理学实验指导”的基础上，参照近几年在科学研究中使用的方法，重新编写了这本书。全书包括营养、消化、呼吸、血液和血液循环、排泄和渗透压调节、生殖以及内分泌生理等七方面的实验共二十三个。除了保留一些经典性的实验外，着重介绍了当前国内外鱼类生理学研究的最新技术和方法，如促性腺激素、类固醇激素和生长激素的放射免疫测定法；脑垂体细胞的免疫细胞化学和电子显微镜观察；各种激素和药物对鱼类产卵的作用；血管导管手术和游泳能力的测定等。书末的附录介绍了鱼类生理学研究中的一些常规操作技能。因此，本书不仅可以作为动物学、水产养殖及有关专业的大学生和研究生的实验课教材，而且对从事动物生理学、鱼类生理学、环境生理学、比较生理学、生态生理学、比较内分泌学和水产养殖等方面研究工作的科技人员来说，也不失为一本有用的参考书。

本书的大部分由林浩然和彭纯编写；梁坚勇和张梅丽编写了个别实验。具体分工如下：林浩然一、二、三、五、八、十、十四、十九、二十二、二十三、和附录；彭纯：四、六、七、九、十一、十二、十六、十八、二十、二十一；张梅丽：十三、十七；梁坚勇：十五。

本书中有个别新方法可能还不够成熟或比较粗糙，但介绍出来后通过大家的共同实践可以促使其逐渐趋于完善。读者可以根据自己实验室的条件选用其中的一些实验或方法。限于作者水平和时间关系，错漏之处在所难免，欢迎读者提出宝贵意见。最后，对于本书的编写和出版给予热情支持的同志表示衷心的感谢！

作 者

1988年10月于广州

目 录

一、鱼类蛋白质利用率的测定	(1)
二、鱼类对饵料表观消化率的测定——放射性同位素 ³² P标记测定法	(7)
三、鱼类肠对 ¹⁴ C—甘氨酸的吸收	(9)
四、温度对鱼类耗氧量的影响	(12)
五、鱼类游泳能力的测定	(15)
六、鱼类血红蛋白含量的测定和血球计数	(18)
七、鱼类全血量的测定	(21)
八、鱼类的血管导管手术	(24)
九、鱼类的心脏灌流	(28)
十、鱼类肾小管的主动运输	(30)
十一、鱼类的渗透压调节	(34)
十二、各种激素对鱼类排卵和产卵的影响	(38)
十三、鱼类卵黄蛋白原的测定	(40)
十四、鱼类促性腺激素的放射免疫测定方法	(42)
十五、鱼类性类固醇激素的放射免疫测定法	(49)
十六、鱼类脑垂体组织结构和超微结构的观察	(54)
十七、鱼类脑垂体激素分泌细胞的免疫细胞化学	(58)
十八、鱼类生长激素的放射免疫测定法	(62)
十九、鱼类甲状腺对碘的积累	(67)
二十、金鱼的应急反应——用放射免疫测定法测定皮质醇的含量	(68)
二十一、鱼类的血糖调节	(71)
二十二、鱼类的体色	(73)
二十三、鱼类的性外激素	(75)
附录	
一、鱼的保持	(77)
二、鱼的麻醉	(77)
三、鱼类的标记	(78)
四、鱼类的生理盐水	(81)
五、鱼类的取血方法	(81)

一、鱼类蛋白质利用率的测定

一、实验目的:

了解鱼类蛋白质利用率测定的基本原理,掌握鱼类蛋白质利用率的测定方法。

二、实验原理:

食物中蛋白质的利用主要取决于它们所含有必需氨基酸状况。食物蛋白质越是能够满足鱼类对必需氨基酸的需要,它的利用率就越高。对蛋白质营养价值的评价、目前比较普遍采用的测定与计算方法之一是蛋白质净利用率(Net protein utilization, NPU):

$$NPU = \frac{I - (F - F_k) - (U - U_k)}{I}$$

式中, I为摄入的总氮; F和U分别为投喂试验饵料的鱼粪便和尿中的氮; F_k 和 U_k 分别为投喂无蛋白饵料的鱼粪便和尿中的氮,即内源性氮的去失量。

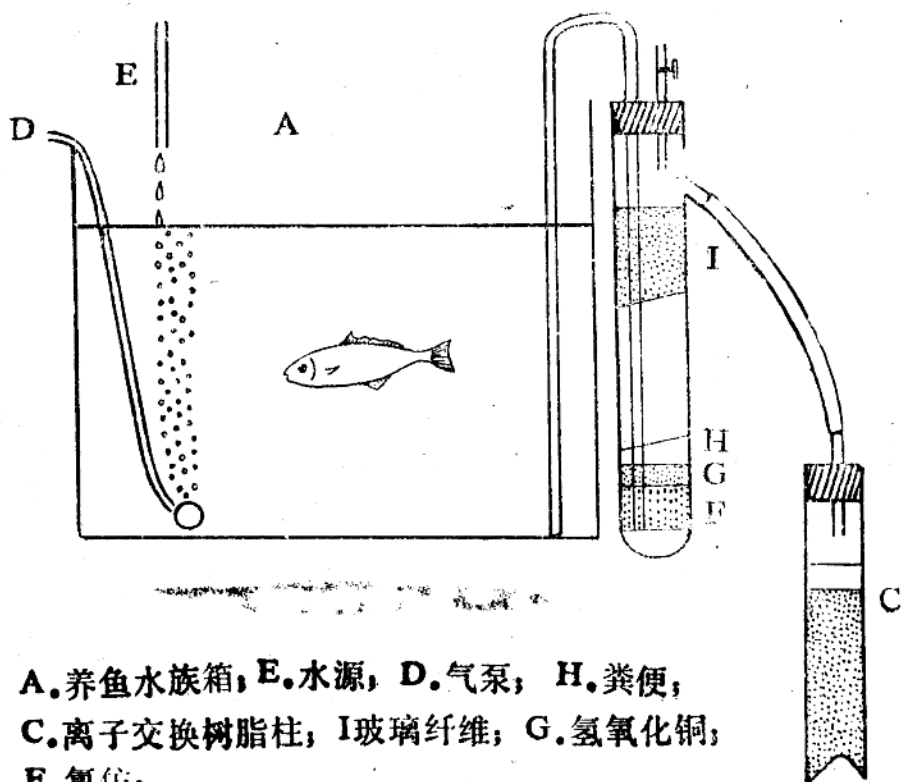
三、材料、仪器用具和药物:

鲫鱼或鲤鱼。水族箱、气泵,虹吸管,鱼粪便收集管,强酸性离子交换树脂柱。克氏定氮仪及定氮所需的各种常规试剂。

四、实验操作:

(一) 实验装置的建立:

如图所示,采用Ogina等(1973)的实验设计,使鱼在不受干扰的情况下测定粪便中和尿中排出的氮。实验装置由三部份组成:(1)养鱼水族箱(A),体积可为35×20×30厘米。每次只容纳一尾鱼进行试验。水族箱应和水源(E)相连接并不断用气泵(D)充气,使试验鱼处于适宜的水环境中。(2)粪便收集管(B),容积约为3.5×25厘米,以一虹吸管和水族箱相连。管内含有氯仿(F)、用做粪便中氮的防腐剂,有氢氧化铜(G),用做蛋白质沉淀剂,还在管中部放置一束玻璃纤维(I),以防止收集的粪便(H)流到管外。(3)强酸性离子交换树脂柱(C),宽约5.5厘米,长约60厘米,直接和粪便收集管的出口连接,用以吸收溶解性的尿和代谢产物的含氮化合物。



**A.养鱼水族箱, E.水源, D.气泵, H.粪便,
C.离子交换树脂柱, I玻璃纤维, G.氢氧化铜,
F.铜箔;**

在实验过程中, 持续的流水 (流速调节为50—100升/24小时) 不断输入 养鱼水族箱, 经过虹吸管进入粪便收集管, 然后进入离子交换树脂柱。所收集的粪便以及可溶性尿和代谢产物的含氮化合物分别用克氏定氮法测定含氮量。

(二) 蛋白质净利用率测定:

挑选体重50—300克左右的试验鱼, 试验前需经过水族箱投饵的适应性训练, 使鱼习惯取食所投给的饵料。

测定鱼代谢性的氮排出量 (包括粪便中的氮, 尿中和代谢产物中的氮) 可使用含有蛋白质的试验饵料, 以及使用无蛋白质的饲料做对照。测定鱼内源性的氮排出量 (即在没有蛋白质摄食时鱼体自身代谢所消耗的体内贮存的氮, 包括尿中和粪便中的氮), 可使用无蛋白饲料, 其配方可采用: 糊精65%, α -淀粉20%, 纤维素5%, 豆油3%, 鲑鱼肝油2%, 矿物质混合物4%, 维生素混合物1%。

试验鱼先在投饵水族箱中定量投饵。投饵量为鱼体重的1.9—2.5%左右 (指饲料干重), 每日三次, 准确记录鱼的摄食的饲料量。鱼摄食后就移入试验水族箱, 收集24小时的排泄物。每次只测定一尾鱼。试验期间调节适宜的流速使水源不断把水注入水族

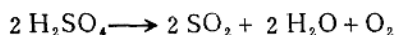
箱，通过粪便收集管和离子交换树脂柱收集颗粒状和可溶性的含氮化合物。24小时后停止给试验水族箱注水，将试验鱼从水族箱取出，使水族箱内的全部水都通过粪便收集管和离子交换树脂柱。将粪便收集管内的全部收集物经过滤纸过滤后收集起来以测定其含氮量。离子交换树脂柱吸附的全部含氮化合物用40% HCl溶出后亦用来测定含氮量。

采用克氏 (kjeldahl) 定氮法测定样品含氮量。其方法附录于下。

[附]克氏定氮法：

一、原理：

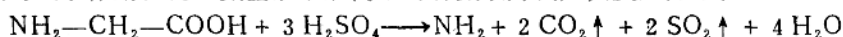
试样与浓硫酸共热，在有机物存在下，硫酸在沸点 (338℃) 时分解成二氧化硫、水及氧。



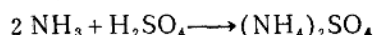
产生的新生态氧具有强的氧化力，在高温时氧化有机物中的碳成二氧化碳，而与氢结合成水。



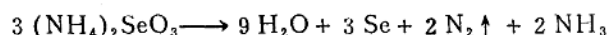
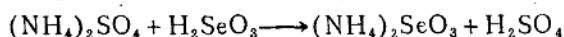
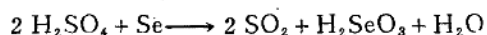
氮在二氧化硫的作用下，还原为氨。在硫酸的作用下，蛋白质分解为氨基酸，后者继续与硫酸作用。现以氨基酸中最简单的甘氨酸为例，其反应如下：



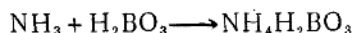
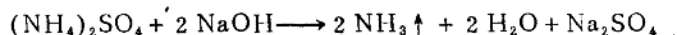
但实际上，其反应要复杂得多，生成的氨马上与硫酸结合。



这一反应过程称为试样的消化。为了加速反应，通常要在消化液中加入少量的催化剂 (如硫酸铜、硒及其化合物等)。提高硫酸沸点的试剂 (如硫酸钾) 或添加其它氧化剂 (如氯酸盐、高氯酸、过氧化氢等)，以少量硒 (0.1克) 为催化剂，可大大缩短消化时间 (约1—3小时)，但消化时间不可过长，否则可能有一部分氮以分子状态损失。



消化液中的硫酸氨与浓氢氧化钠反应，分解为氢氧化氨，后者不稳定，可分解出氨，借水蒸汽蒸馏法可将氨带出用硼酸或盐酸溶液将蒸出的氨吸收。



这一步骤称为氨的蒸馏。

最后，用标准酸溶液滴定生成的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ (如用一定量的盐酸吸收蒸出的氨，则用标准碱溶液滴定剩余的酸——回滴法)。由此可计算试样的含氮量。

因为蛋白质的平均含氮量约为16%，故将样品含氮量乘以6.25即为试样蛋白质含量。对于不同种类的蛋白质，其含氮量稍有差异，故计算时，氮和蛋白质的换算系数须相应修正。但在一般营养分析中，换算系数通常定为6.25。

用本法定氮，试样中的非蛋白氮也同时被测定，故称为粗蛋白含量。整个操作过程，环境中不应有氨。

二、试剂和器材：

器材：

1. 电炉 1000W
2. 消化架，可用粗铁丝扎制，使克氏烧瓶可以斜靠在电炉上加热。
3. 克氏烧瓶 50ml或100ml。
4. 半微量定氮仪。
5. 三角锥瓶 50ml。
6. 半微量滴定管，酸式10ml。
7. 量筒 5—10ml。
8. 移液管 2 ml、5 ml。
9. 容量瓶 1000ml、100ml。
10. 分析天平。
11. 长镊子。
12. 小纸筒，用绘图硫酸纸或铝箔卷成直径约1厘米的小纸卷，一端折转封闭成为可装样品的小纸筒。
13. 小称瓶，大小可以竖着放入小纸筒。
14. 电热恒温干燥箱。

试剂：

1. 浓硫酸 分析纯。
2. 0.5%硒—硫酸混合液：100毫升浓硫酸加入0.9克硒粉。用时摇匀。
3. 30%过氧化氢 分析纯。
4. 氢氧化钠饱和溶液。
5. 2%硼酸溶液：20克硼酸溶于1升无氨蒸馏水中。
6. 混合指示剂：0.1%溴甲酚绿的95%酒精溶液10毫升与0.1%甲基红的95%酒精溶液2毫升混合，此混合指示剂在碱性时呈绿色，酸性时呈红色，中性时呈淡葡萄紫色。
7. 盐酸标准储备液，0.1000N：取浓盐酸（比重1.19）8.4毫升，稀释至1升。以硼砂或无水碳酸钠标定，调节浓度刚为0.1000N。
8. 盐酸标准溶液，0.0100N：用0.1000N盐酸1000毫升稀释，定容至1升。
9. 无氨蒸馏水：在蒸馏烧瓶的水中加进数滴甲基橙指示剂，再滴加硫酸至红色（稍过量），然后进行蒸馏，蒸出的蒸馏水即为无氨蒸馏水。试剂的配制及仪器的洗涤均用无氨蒸馏水。

三、操作方法：

1. 样品的消化：将小纸筒放入称瓶中，加入约0.5克试样，然后置105℃烘箱中烘至恒温，冷却并称重后，用长镊子夹住纸筒底部突起处，斜向上插入至克氏烧瓶底部，然后连烧瓶一起倒转直立，试样即无损失地倾入瓶底，然后小心取出纸筒，放回称瓶中，称重，计算试样重量。接着，在烧瓶中加入6毫升0.5%硒-硫酸混合液，轻轻转

动烧瓶，使试样全被酸湿润，再加入4毫升30%过氧化氢（最好分几次加入，以防反应过剧烈，将试样溅出。操作应在通风橱中进行）。在剧烈反应停止后，投入数粒玻璃珠，置电炉上加热煮沸，直至溶液澄清（无色或只呈微黄色，约需20—30分钟，一般不超过1小时）。冷却后，用无氨蒸馏水定容至100毫升，每种样品需同时做2—3个平行测定。另取二个克氏烧瓶，不放样品，而分别加6毫升硒-硫酸混合液和4毫升过氧化氢作为空白，往后的处理方法与样品相同。

2. 蒸馏：取3只干净的50毫升锥形瓶，加入2%硼酸溶液10毫升及混合指示剂4—5滴，这时瓶内液体应呈葡萄紫色，用小烧杯盖好备用，若瓶内液体呈绿色，表示烧瓶不干净，应弃去溶液重洗。

克氏定氮仪实际上是一套蒸馏装置（见附图），蒸汽发生器是一容量为2升的平底烧瓶，其中装入加有数滴浓硫酸和数粒沸石的蒸馏水（最好加数滴甲基橙指示剂，以便随时观察瓶中的水是否呈酸性）。克氏定氮仪在使用前需用蒸汽洗涤10分钟左右，然后将一只装有硼酸液和指示剂的小锥形瓶置冷凝管下，调节锥形瓶的高度，使冷凝管末端浸入液面以内，继续蒸馏1—2分钟，如接受液不变色，表示仪器已洗净，可以应用，移去硼酸液，用蒸馏水冲洗冷凝管口，开始样品蒸馏。

转动三通活塞。将蒸汽放空，由于仪器夹层温度降低，产生负压，反应室中的残液被倒吸入夹层中，旋开排液管螺旋夹，排出夹层中废液，转动三通活塞，导通蒸汽，这时蒸汽经过夹层由排液管排出，将盛有10毫升2%硼酸液的小锥形瓶置冷凝管下端，并使冷凝管尖端浸入液面以下，提起小玻璃杯里的棒状玻塞，用移液管准确加入样品消化液2.0毫升至反应室中（样品含氮量低，样品液可改为5.0毫升）。用少量蒸馏水洗涤数次，使沾于小玻璃杯或玻塞的样品消化液全部进入反应室，塞回玻塞，拧紧排液管螺旋夹，在小玻璃杯中加3毫升饱和氢氧化钠，然后慢慢地稍提起玻塞，使氢氧化钠溶液缓慢地流入反应室中，至玻璃杯中尚有少量碱液时，塞紧玻塞，加入约3毫升蒸馏水，再依同法放入反应室中，并留少量碱液在小玻璃杯中作水封，然后计时，蒸馏5分钟后，降低锥形瓶，使冷凝管口离开液面，继续蒸馏约30秒，用少量蒸馏水冲洗冷凝管中，移开锥形瓶，用小烧杯盖好留待测定。

3. 仪器的洗涤：蒸馏完毕，必须把反应室中残液吸去、洗净，这时可转动三通活塞，将蒸汽放空，则反应室的残液倒吸，流水夹层，至残液刚好倒吸完，又立即导通蒸汽，蒸汽重又进入反应室，可起洗时作用，同时用少量蒸馏水冲洗小玻璃杯和棒塞上的碱液，洗液流入反应室，依前法吸去洗液，如是重复三次，打开螺旋夹，排出夹层中的废液，即可进行下次蒸馏。

4. 滴定：蒸馏液用0.0100N盐酸标准滴定，至锥形瓶中的液体由绿色刚好转变为淡葡萄紫色，记录标准溶液耗用量。

5. 计算：

$$\text{样品含氮量}\% = (\text{样品滴定值} - \text{空白滴定值}) \times \frac{N \times E}{1000} \times \frac{D}{V} \times \frac{100}{W}$$

（以干样计）

$$\text{样品粗蛋白含量, \%} = \text{样品含氮量}\% \times 6.25$$

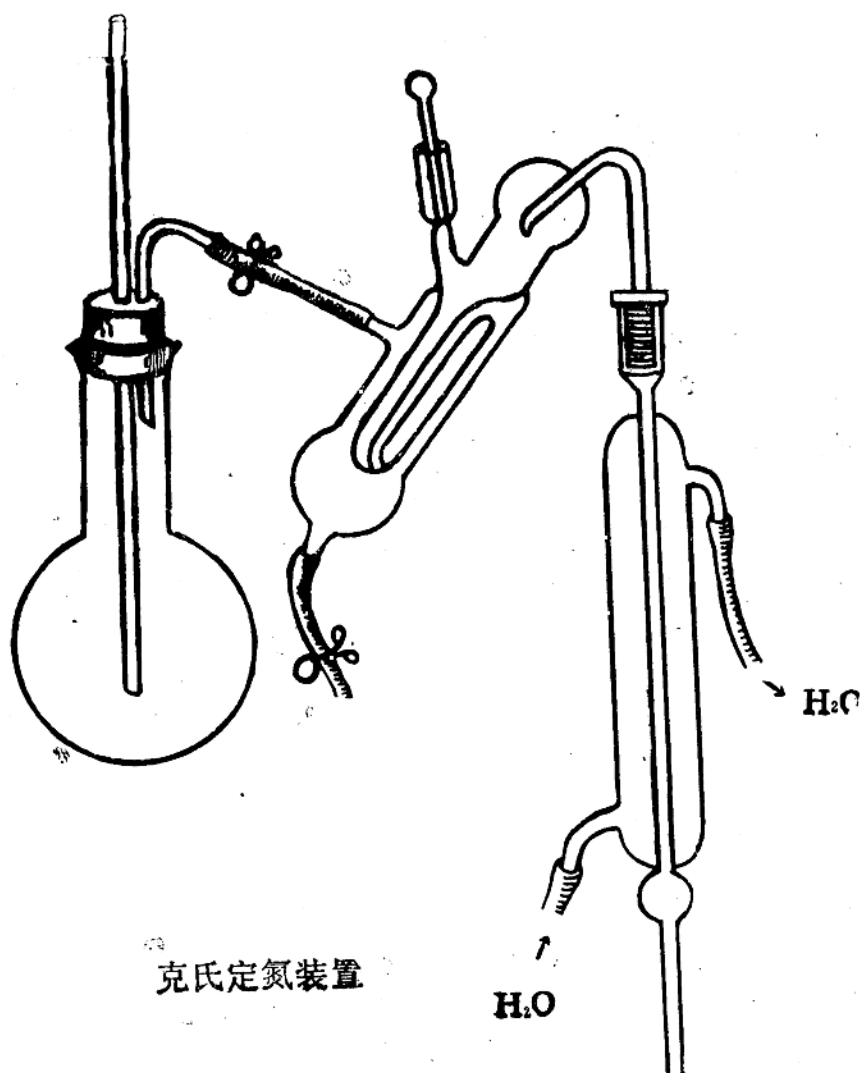
式中：N 标准酸液的当量浓度

E——氮的当量 (14)

D——样品消化后定容体积 (ml)

V——用于测定的消化液体积 (ml)

W——样品重 (g)



二、鱼类对饵料表观消化率的测定

——放射性同位素 ^{32}P 标记测定法

一、实验目的：

了解养殖鱼类对饵料消化吸收和代谢的特点，掌握应用放射性同位素测定鱼类对饵料消化吸收的基本方法。

二、实验基本原理：

应用放射性同位素标记饵料投喂鱼类，然后分别测定鱼体内和饵料中的放射性强度，由于鱼体内的放射性强度能反映鱼对所摄食饵料的消化吸收量，因而，对比饵料中的总放射性和鱼体中的总放射性，就可计算出鱼对某种饵料的消化吸收率。

三、实验材料和设备：

草鱼10—20尾，假水仙（风眼兰），两耳草，放射性同位素 ^{32}P ，试验塘、水族箱，解剖用具。同位素实验室的基本设备。

四、实验步骤：

（一）鱼种的选择与驯养：选择体长与体重大小一致的草鱼10—20尾分别在两口试验塘中驯养10天，设置食台分别投喂假水仙和两耳草，使草鱼习惯于试验塘环境和取食这两种饵料。

（二）饵料的采集与标志：在校内浅塘采集假水仙（连根）约5公斤，在校内草地采集两耳草（连根）约1公斤，用水冲洗干净，采用同位素 ^{32}P （化合物状态为 Na_2HPO_4 ）进行标记。把 Na_2HPO_4 溶液引入KnOP氏培养液中，比活性为 $100\mu\text{Ci}/\text{升}$ 。把标记溶液置于中型水族箱中，水深约7厘米。将洗净的假水仙和两耳草移入标记溶液中，经48小时取出，用自来水充分冲洗，剪弃根部，分别切碎和称重，作为投喂草鱼的饵料。另称取标记的两耳草和假水仙鲜重各20克烘干研磨，测定其含水量和放射性强度。

（三）投喂与取样：将标记的假水仙和两耳草分别在两口试验塘的食台内投喂草鱼。投喂后24小时和72小时分别捕捉草鱼，在实验室内进行解剖与测定。将草鱼吃剩的两耳草与假水仙仔细捞取并称重，以投喂量减去剩余量就得到各个试验塘草鱼实际吃进的标记的两耳草和假水仙的重量。

(四)解剖与测定: 将已取食放射性³²P标记的鲢鱼取回实验室,测量体长和体重,进行仔细解剖,将鳞片、鳃、肝胰脏、心脏、肾脏、脾脏、、肠管、脑髓、骨骼、肌肉等分别分离出来,称其重量。各器官与组织分离之前先抽取少量血液样品,准备测定。肠管内含物仔细挤净,分别称肠壁重和内含物量。肠内含物可分为前肠(肠管在第一盘曲前的一段)和后肠两部份,因消化吸收的时间不同,它们的放射性强度亦不同。

把鱼体各部份和内脏器官以及血液、肠内含物等分别用解剖剪剪碎或用研钵磨碎,做成样品,并取鲜重200毫克(每个器官或组织各有两个平行样品)用国产FH-408自动定标器及三用闪烁探头测定放射性强度,以cpm(每分的脉冲数)表示。

(五)数据处理与分析: 先用下列公式求出每克鱼体重量(即包括各个器官和组织)的放射性。

$$\text{每克鱼体重量的放射性} = \frac{\text{鱼体各部份和内脏器官放射性} - \text{肠内含物放射性}}{\text{鱼体总重量(克)}}$$

然后采用下列公式计算草鱼对两耳草和假水仙的消化吸收率。

$$\text{吸收率} = \frac{\text{每克鱼体重量的放射性(cpm)}}{\text{平均每克鱼体吃进的标志植物的放射性(cpm)}} \times 100$$

由于同位素³²P半衰期为14.3天,对不同时间取样测定的数据都要对衰变修正值进行计算。

根据整理的数据可以分析草鱼取食24小时和72小时后,对两耳草和假水仙的消化吸收率,以及吸收后在鱼体内各个器官与组织中分布与代谢的基本情况。

五、注意事项:

1. 严格注意安全防护,试验前要预先估计鱼塘水容量,使投喂放射性饵料后的塘水放射性水平符合国家规定的最大容许浓度。

2. 试验前要对试验塘彻底清理,除去野杂鱼和塘周围杂草,以保证草鱼只取食标记的饵料。

3. 在测定草鱼对假水仙的消化吸收率之前,草鱼要经过二周的驯养(即投喂假水仙,使草鱼习惯取食)。

4. 试验用的草鱼大小要一致。制样时取样要均匀。

5. 在不同时间取回的鱼体在解剖前,先用射线检测仪检查其表面放射性情况,以大致了解鱼类取食放射性饵料的情况。

三、鱼类肠对 ^{14}C -甘氨酸的吸收

一、实验目的:

了解鱼类对氨基酸的吸收过程以及影响氨基酸吸收的主要因素,掌握研究鱼类小肠对氨基酸吸收过程的基本操作方法。

二、实验原理:

氨基酸是蛋白质消化分解的最后产物、为肠壁所吸收。氨基酸在肠壁的吸收过程和葡萄糖相似,在哺乳类已证明 Na^+ 和氨基酸吸收在机能上是偶联的;代谢毒物(如氰化物)抑制 Na^+ 的流出,同时也抑制肠壁对氨基酸的吸收。有些氨基酸的吸收途径已经了解清楚,例如中性氨基酸有相同的吸收途径,它们的输送是互相竞争的,并且亦和葡萄糖与半乳糖,单糖的吸收途径相同而互相竞争。碱性氨基酸(如赖氨酸和精氨酸)有另外的吸收途径,而二羧(酸)氨基酸的吸收途径还不清楚,但它们在粘膜细胞内通过转氨作用而产生丙氨酸。

三、实验仪器,用具和材料:

液体闪烁测定仪、同位素实验室的常规仪器和用具、分析天平、瓷盒、烧瓶、恒温水浴锅、解剖用具。

四、实验试剂:

(一) ^{14}C -甘氨酸: 准备 ^{14}C -甘氨酸的水溶液。每组学生需要使用1微居里 ^{14}C -甘氨酸。取1微居里放入小试管内用20mm的未标记L-甘氨酸溶液稀释至1.2毫升。

(二) 20mm的未标记L-甘氨酸溶液: 配制淡水鱼类生理盐水,再将0.224克L-甘氨酸加入100毫升生理盐水中。

(三) Krebs-磷酸盐溶液:

先配制下列Krebs-磷酸盐的贮备溶液:

1) 0.9% NaCl (0.154M)

2) 1.15% KCl (0.154M)

3) 1.22% CaCl_2 (0.11M)

4) 3.82% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.154M)

5) 磷酸缓冲液、 $\text{pH}7.4$ (0.11M)。将17.8克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解于500毫升

蒸馏水中，加入20毫升1 N HCl，最后用蒸馏水稀释到1升。

临使用前才配制krebs-磷酸盐溶液，取1)液100毫升、

2)液4毫升、3)液3毫升(应最后才加入)、4)液1毫升、

5)液20毫升配制而成、配制好的krebs-磷酸盐溶液一般可使用一星期。

(四) krebs-磷酸盐——葡萄糖溶液(20mm)：将3.6克葡萄糖加入一升 krebs-磷酸盐溶液中。

(五) krebs—磷酸盐溶液加入氰化钠($4 \times 10^{-4}m$)：将0.0296克NaCN加入一升 krebs-磷酸盐溶液中。

(六) krebs—磷酸盐——旦氨酸(20mm)溶液，将2.98克L—蛋氨酸加入一升krebs-磷酸盐溶液中。

(七) 组织增溶剂(tissue solubilizer)。

五、实验步骤：

(一) 孵育溶液的制备：取5个50毫升烧瓶分别加入下列溶液，(瓶1和2是一样的)，

烧瓶 编号	溶 液
1	4 毫升krebs-磷酸盐溶液+0.2毫升 ^{14}C -甘氨酸溶液
2	4 毫升krebs-磷酸盐溶液+0.2毫升 ^{14}C -甘氨酸溶液
3	4 毫升krebs-磷酸盐-葡萄糖溶液+0.2毫升 ^{14}C -甘氨酸溶液
4	4 毫升krebs-磷酸盐-氰溶液+0.2毫升 ^{14}C -甘氨酸溶液
5	4 毫升krebs-磷酸盐——旦氨酸溶液+0.2毫升 ^{14}C -甘氨酸溶液

每个烧瓶均用95%O₂和5%CO₂充气1分钟，塞紧并置于室温下。

(二) 肠“环”的制备：用MS-222或喹那定将鱼麻醉，剖开腹腔，取出肠中段置于预先铺上滤纸并浸以生理盐水的瓷盆内，用剪刀剪成一系列长约2—3毫米的肠“环”。每组实验室至少需要15个肠“环”。

(三) 孵育：在上述的5个烧瓶内分别放入3个肠“环”；再用95%O₂和5%CO₂充气，塞紧；在室温孵育一小时，保持每分钟振动约80次。

(四) 制备用于液体闪烁测定的肠“环”。孵育1小时后取出5个烧瓶依次放在一个大瓷盆内，下面用湿毛巾垫住。每个烧瓶的样品依次做如下处理：用镊子取肠“环”置于滤纸上将水份吸干，用分析天平仔细称每个肠“环”重量(至毫克)。将每个烧瓶的已称重的三个肠“环”放入含有1毫升组织增溶剂的闪烁管内，把盖拧紧并编号。

接着准备孵育溶液的测定管；从每个烧瓶取0.1毫升的孵育溶液加入含有1毫升组织增溶剂的闪烁管内，把盖拧紧并编号。

总共制备10个闪烁管用于液体闪烁测定，其中5管含有肠“环”，5管含有孵育介质。

另外，在1闪烁管内加入1毫升组织增溶剂和0.1毫升生理盐水以测定本底放射性强度。

将全部11支闪烁管在室温孵育过夜。管盖务必塞紧以防止蒸发。

(五) 液体闪烁测定：经过一夜孵育后，每支闪烁管加入10毫升闪烁液。在液体闪烁测定仪测定一小时，将测定值换算为CPM。每管的CPM均去减本底的CPM。

(六) 数据整理：

$$\text{每个烧瓶的肠“环”吸收}^{14}\text{C-甘氨酸的溶液} = \frac{\text{总的CPM}}{\text{肠“环”重量(毫克)}}$$

$$\text{每个烧瓶孵育介质的}^{14}\text{C-甘氨酸浓度(CPM/微升)} = \frac{\text{总的CPM}}{100}$$

$$\text{然后计算每个烧瓶的浓度比} = \frac{\text{CPM/毫克组织}}{\text{CPM/微升介质}}$$

绘制图表分析说明实验结果。着重分析：

- (1) 蛋氨酸和甘氨酸在肠吸收过程的关系；
- (2) 葡萄糖对肠吸收甘氨酸的影响；
- (3) 氰对肠吸收氨基酸的影响；

四、温度对鱼类耗氧量的影响

一、实验目的：

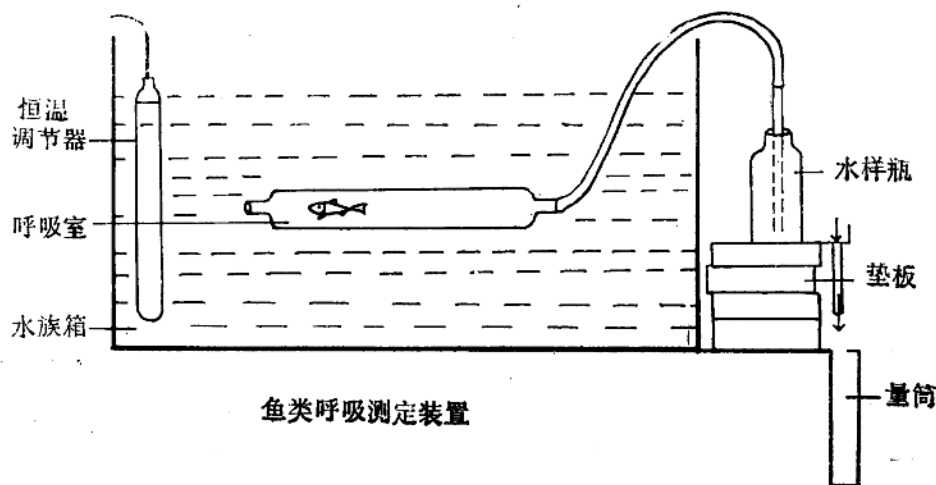
了解外界水温对鱼类耗氧量的影响，掌握溶解氧测定的基本方法。

二、基本原理：

在一个流水系统中，当不同温度的水分别以一定速度流经呼吸室时，由于呼吸室内试验鱼的呼吸作用，消耗了水中的溶解氧。通过测定进水口和出水口溶解氧以及水流量，即可计算出某一温度下鱼的耗氧量。

本实验采用温克勒（Winkler）滴定法和YSI 51B测氧仪测定水中的溶解氧。

Winkler法的原理是：把 MnSO_4 和碱性碘化钾加到水样中，形成 Mn(OH)_2 ，后者能与水样中的溶解氧结合，经酸化后释放出与溶解氧等量的游离碘，再以硫代硫酸钠滴定而定量。



YSI 51B测氧仪由仪表、探头、附件三部分组成。探头是一个完整的自身极谱记录系统，套在感应器上的一张可透性膜把感应器元件与环境隔开，但气体可以进入。当在感应器上施加极化电压时，已通过膜的氧在阴极反应，产生电流。通过膜的氧与膜两侧的压力差成正比。由于氧在阴极被迅速消耗掉，所以可以假定膜内的氧分压为零。因此，使氧扩散入膜的力就与膜外氧的绝对压力成比例，如果氧压力增加，通过膜扩散的氧越多，流经感应器的电流也就越大。反之，低的氧压力引起小的电流。这样，根据

电流的大小可以间接知道环境中氧的多少。测氧仪就是应用这个原理，把探头测出的电流大小转换成溶氧量，显示在刻度盘上。

三、材料和器材：

1. 材料：金鱼、罗非鱼或其他鱼均可，视具体情况而定。

2. 试剂：

(1) 浓硫酸：比重1.83~1.84。

(2) 硫酸锰溶液：称480克 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 或400克 $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于蒸馏水中，过滤后稀释至1升。

(3) 碱性碘化钾溶液：称取500克分析纯 NaOH （或700克 KOH ）和150克 KI （或135克 NaI ）于1升蒸馏水中（钾、钠盐可以互换）。此溶液不能有碳酸盐存在，如果有沉淀，需先过滤。

(4) 硫代硫酸钠溶液：称取24.82克的分析纯 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶于煮沸并已冷却的蒸馏水中，定容至1升。此液为0.1N，使用前稀释至0.01N。也可以称取2.482克溶于1升水中。溶液可加入0.2克无水碳酸钠或一滴二硫化碳。贮于棕色瓶中。

(5) 1%淀粉溶液：取2克淀粉，先加少量蒸馏水调成糊状，再加入煮沸的蒸馏水至200ml，冷却后加入1ml冰醋酸或0.25克水杨酸防腐。

(6) 氯化钾半饱和溶液：溶解 KCl 于蒸馏水中成饱和溶液后加入等量蒸馏水。

3. 器材：

(1) 溶解氧瓶：250ml的试剂瓶，用量体积法先测定各瓶盛满水并塞紧瓶盖时的实际水容积，并做好记录。

(2) 酸式滴定管。

(3) 250ml锥瓶。

(4) 各种大小的吸量管。

(5) 鱼类呼吸测定装置。

如图所示，在一个用恒温计调好温度的水槽或水族箱中，放入一个鱼类呼吸室。该室可用塑料盒，广口瓶、带胶塞的直径较大的塑料管或玻璃管制成。

四、操作方法：

(1) 按图所示接好测定装置，并把称好重量的鱼放入呼吸室中通过升高或降低样品瓶的位置来调节流速；流速通过收集一定时间内溢出样品瓶的水量来确定。调节流速大约1ml/分钟/克鱼体重。

(2) 经过一段时间（约一小时），让呼吸室和样品瓶的氧达到平衡以后，开始取水样；此为出水口水样，同时取水样箱中的水样作为进水口水样品。

(3) 在水样中加入1ml MnSO_4 溶液。1ml 碱性碘化钾溶液，立即盖好瓶塞（吸量管应浸入液面），颠倒混合，静置3~4分钟，然后再沿瓶口加入1ml浓硫酸，

盖好瓶塞，混合均匀至沉淀全部溶解，静置数分钟（整个操作过程中不能使气体进入，如水样瓶中有气泡，则样品作废）。

（4）用吸量管取50ml经上述处理的水样于250ml锥形瓶中，立即用0.01N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液滴定，至水样呈淡黄色时，加入1ml 1%淀粉液，继续滴定至蓝色刚好消失，记录 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的用量。做三个平行样品，取算术平均值。

（5）再取一份出水口和进水口水样，准备用测氧仪测定。

（1）准备探头：

左手握住探头，把压力孔转向右侧，一边加KCl溶液，一边用铅笔的橡皮端压隔膜，不断加直到没有气泡出现，然后把膜盖上（不能起皱或有气泡残留）再套上环，剪掉多余的膜、擦掉过多的KCl，套上保护罩、备用。

（2）准备仪器：

开关处于off时，调节指针于机械零点；把开关开到ZERO，调节指针至“0”（nig/l scale）；把开关开至full scale，调至15mg/l scale，把准备好的探头插到仪器上，等15分钟让探头稳定，然后再把开关开到CALIB O_2 ，调整CALIB直到仪器表面右上角的短刻度显示出本地的海拔高度。

（3）溶解氧的测定：

把探头插入水样中，停留2分钟；把开关开至TEMP，读出温度后，再把 O_2 solubility factor 旋钮拨到所观察到的温度，然后把开关转到READ O_2 ，便可直接从表面上读出溶解氧的量（mg/l）。

调整水族箱的温度为20℃、30℃，分别测定这两种情况下的耗氧量并做对比分析。

五、计算：

$$\begin{aligned}\text{溶解氧(Winkler法)}(\text{MgO}_2/\text{l}) &= \frac{A \times N \times a \times 1000}{V_s - \frac{V_s}{V} V_r} \\ &= \frac{A \times 0.01 \times 8 \times 1000}{50 - \frac{50}{V} \times 2} = \frac{30 \times A}{50 - \frac{50}{V} \times 2}\end{aligned}$$

A——滴定时所用的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 量；

N—— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 当量浓度；

a——氧的当量；

V_s ——滴定时所用的水样体积；

V——水样瓶容积；

V_r ——水样中所加入的 MnSO_4 和 KI 溶液总体积；

$$\text{鱼的耗氧量}(\text{mgO}_2/\text{克} \cdot \text{小时}) = \frac{(A_1 - A_2) \times V}{W}$$

A_1 ——进水口溶氧量（ mgO_2/l ）；

A_2 ——出水口溶氧量（ mgO_2/l ）；

V——流速（l/小时）；

W——鱼体重（g）；