



全国高等农业院校教材



昆虫生理生化实验

● 南京农业大学 主编
● 植物保护、农业昆虫专业用

农业出版社

全国高等农业院校教材

昆虫生理生化实验

南京农业大学 主编

农业昆虫、植物保护专业用

农业出版社

前 言

“昆虫生理生化实验”是“昆虫生理生化学”课的重要组成部分，通过实验帮助学生理解课堂讲授的基本理论，学习并掌握从事昆虫生理生化研究的基本技能。

本书作为“昆虫生理生化学”的配套教材是在我们十多年来教学实践的基础上编写而成的，在编写过程中学习和吸收了国内外农业院校的一些实验方法，以满足当前昆虫专业教学的需要，同时为各校昆虫生理生化学同行，提供一些常规的研究方法和参考资料。

实验是按照昆虫的内部系统编排的，其顺序为体壁、消化、排泄、循环、呼吸、肌肉、内分泌、感觉、神经、生殖和脂肪体。鉴于各系统的结构与昆虫生理活动和生化反应有着紧密的联系，因此每个系统均包括结构与功能、生理技术和生化分析等三方面的实验内容。在每一系统的结构部分都配有相应的插图，使学生能从细胞水平入手，直观理解昆虫生理生化代谢的普遍性和特殊性。实验所用的昆虫材料都是各地易于得到的虫种，例如鳞翅目的小地老虎、粘虫、棉铃虫和家蚕，鞘翅目的黄粉甲和蜚蠊目的蜚蠊等。

本教材共编有30个实验，但按目前的学时数只需做13—15个，各院校可根据本校的条件，在教学大纲规定的范围内，进行选择。我们在编写本教材的同时，还准备了若干套组织切片、示范图片与幻灯片，可作为辅助教材使用。

本书在编写过程中，曾得到尤子平教授的关心和鼓励，以及有关老师的帮助，许多兄弟院校同行也给予热情支持，

王金堂同志协助绘图，一并在此表示衷心感谢。由于编者水平有限，错误或疏漏之处在所难免，敬请批评指正，以便今后修正。

作 者

1991年12月

目 录

实验一	体壁结构和水分蒸腾作用的观察	1
实验二	体壁几丁质的分析	4
实验三	表皮蛋白质的检测	8
实验四	蜕皮腺结构和脱皮行为的观察	11
实验五	消化道结构和细胞功能性分化的观察	15
实验六	中肠消化酶的定性分析	21
实验七	中肠酯酶活力的测定	26
实验八	取食行为与食物选择性试验	30
实验九	马氏管结构和排泄功能的观察	33
实验十	背血管和血细胞结构与功能的观察	39
实验十一	血淋巴中糖和氨基酸的薄层层析	48
实验十二	血淋巴蛋白质的定量测定	53
实验十三	血淋巴中甘油酯含量测定	57
实验十四	血淋巴和组织中蛋白质及酶类的分离(聚丙烯酰胺凝胶电泳法)	61
实验十五	气管结构和变异的观察	69
实验十六	呼吸节律的测定	75
实验十七	呼吸率和呼吸商的测定	79
实验十八	飞行肌结构和飞行能力的观察	84
实验十九	肌肉和组织中海藻糖酶的测定	91
实验二十	内分泌器官的结构和激素分泌临界期的观察	97
实验二十一	性信息素生理效应的观察	100

实验二十二	化学感受器的试验	106
实验二十三	复眼结构和视觉机能的观察	111
实验二十四	神经结构和动作电位的观察	115
实验二十五	蜚蠊尾须感受器与大神经的试验	120
实验二十六	乙酰胆碱酯酶活力的测定	124
实验二十七	生殖器官结构和生殖细胞发生的观察	128
实验二十八	染色体的制备与观察	135
实验二十九	脂肪体结构和变态期形态变化的观察	138
实验三十	共生物的观察	142
附录		145
一、	几种试验昆虫的饲养方法	145
二、	昆虫的石蜡切片技术	148
三、	华氏呼吸仪反应瓶常数的测定	155
四、	几种缓冲液的配制	160
五、	常用昆虫的生理盐水	162

实验一 体壁结构和水分蒸腾 作用的观察

昆虫的体壁由表皮、皮细胞层和底膜组成。表皮又可分为内表皮、外表皮和上表皮。表皮不但覆盖于体壁的表面，而且铺衬在起源于外胚层的器官（如前、后肠，气管，雌、雄生殖道）内表面，特化成内膜。内、外表皮是以一种薄片构型沉积的，几丁质纤丝在相邻片层之间按一定角度旋转，蛋白质填充其间，因而在表皮横切面上，可见到几丁纤丝呈抛物线旋转。昆虫的上表皮包括护蜡层、蜡层和角质精层等，具有阻止水分蒸腾的性能，但是水分或其它物质，仍可通过扩散作用，从体壁的某些部位（如节间膜、气门和感觉器等）排出体外。此外，虫体不同部位的水分蒸腾情况，还能利用无水氯化钴来监测，由于无水氯化钴为天蓝色，它具有很强的吸水能力，吸水后立刻变为粉红色。所以将无水氯化钴制成无水胶液，涂布于虫体表面，由于不同部位的水分蒸腾量不同，各部位氯化钴变色的速度有明显差异。

本实验的目的和要求是观察体壁结构层次、内表皮的片层结构以及体壁外长物和皮细胞腺，了解体壁的不同部位水分通透性的差异，掌握观察体壁水分蒸腾作用的简易方法。

一、材料和器具

（一）供试昆虫 5—6龄鳞翅目幼虫。

(二) 试剂及配制

1. 分析纯丙酮。
2. 无水氯化钴，如已吸水，可用钳锅灼烧脱水至天蓝色，呈固体结晶。
3. 醋酸纤维（或用香烟过滤嘴芯代替）。

(三) 仪器及用具

1. 显微镜。
2. 玻璃棒、具塞小瓶、载玻片、透明胶带纸。
3. 组织切片和示范照片 鳞翅目昆虫的幼虫、蛹和成虫的体壁切片；内表皮几丁纤维的电镜照片。

二、内容和方法

(一) 体壁结构的观察 在显微镜下观察小地老虎等鳞

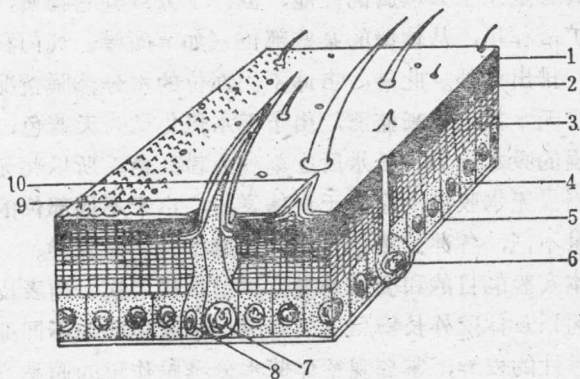


图1 昆虫体壁结构模式图(仿 Richards)

1. 上表皮 2. 外表皮 3. 内表皮及片层 4. 皮细胞 5. 底膜 6. 皮细胞腺 7. 毛原细胞 8. 膜原细胞 9. 刚毛 10. 外突

翅目昆虫的幼虫，蛹和成虫的体壁切片（参照图1），区分上表皮、外表皮、内表皮、皮细胞层和底膜等层次；观察体壁上细胞性和非细胞性的外长物，如刺、毛、鳞片和表皮的刻纹，注意单细胞腺和多细胞腺形态的差异；比较幼虫、蛹和成虫体壁结构的异同。

再观察表皮的电镜照片，注意识别内表皮及外胚层器官内膜上的片层结构，在这些片层中，几丁质纤丝按一定角度旋转排列，切片后呈显出抛物线构型。

（二）体壁水分蒸腾作用的观察

1. 胶液制备 称取无水氯化钴0.5g，放入小瓶内，用玻棒研碎，加入丙酮3ml，再加入适量醋酸纤维（或加入香烟过滤嘴芯2—3个），溶解搅拌均匀，即成天蓝色胶状液体。

2. 观察步骤 用玻棒蘸取胶液，迅速在载玻片上涂一薄层，将幼虫背部朝下，压在胶层上，并用透明胶带纸固定虫体，不让胶层与空气接触。同时用胶层作一空白试验，不用幼虫，只用胶带纸封固胶层。观察虫体和玻片间胶液的颜色变化，并注意虫体背板与节间膜等不同部位胶层颜色的差异。

试验时如空气湿度过高，操作要迅速，以免吸湿。

三、作业与思考

1. 绘制你所观察到的昆虫体壁结构图。
2. 比较鳞翅目昆虫的幼虫、蛹和成虫的皮细胞和体壁外长物的异同。
3. 记录体壁水分蒸腾作用的试验结果，并解释其原因。

实验二 体壁几丁质的分析

几丁质是高分子的含氮多聚糖，分子式为 $(C_8H_{13}O_5N)_n$ ，存在于体壁的原表皮和起源外胚层的器官内膜中。几丁质是表皮的主要成分之一，一般占表皮干重的20—50%，表皮的若干重要物理性质多与几丁质有关。在高温和碱性条件下，几丁质脱去乙酰胺基形成几丁糖，而几丁糖经碘和稀酸作用后呈紫色。

本实验的目的和要求是检测体壁的表皮中有无几丁质的存在，测定昆虫在生长发育过程中表皮几丁质含量的变化。

一、材料和器具

(一) 供试昆虫 不同日龄的鳞翅目老龄幼虫（或直翅目若虫），蝗虫，蝉蜕，蜚蠊卵囊的外壳以及家蚕的卵。

(二) 试剂及配制

1. 饱和氢氧化钾液 氢氧化钾16g 溶于100ml 水中。
2. 酒精溶液 95%，70%，50%，30%；纯酒精。
3. 0.03%碘-碘化钾溶液 30mg 碘和 5g 碘化钾溶于 100ml 水中。
4. 1%和75%的硫酸溶液。

(三) 仪器及用具

1. 分析天平。

2. 电炉 (100—300W)。
3. 解剖用具。
4. 试管, 量筒, 烧杯, 玻璃管, 橡皮塞, 橡胶管, 培养皿, 滤纸。
5. 白磁点滴试验板。
6. 温度计 (200℃)。

二、内容和方法

(一) 几丁质定性分析

1. 消化管制备 取试管一根, 配以橡皮塞, 在橡皮塞上打一个直径约为 5mm 的孔, 插上玻璃管, 橡皮塞外端的玻璃管上再连接一根橡皮管, 长约 30—50 cm, 橡皮管的另一端再接一根一端拉细的开口的玻璃管, 并将开口的玻璃管通入水槽内, 以防加热时碱液溅出 (参照图 2)。

2. 取蝗虫体壁、蝉蜕和蜚蠊的卵囊外壳数块 (每块约 10mm), 另取家蚕卵粒若干, 分别放入装有 8ml 饱和氢氧化钾的上述试管中, 塞紧带有橡皮管的橡皮塞, 置于甘油浴中加热

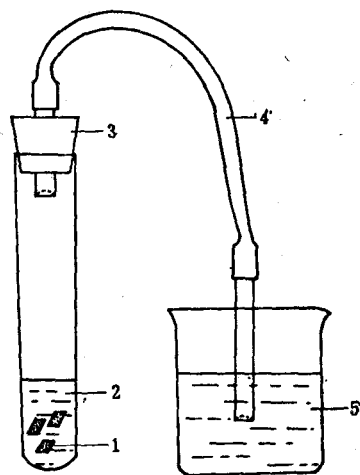


图 2 消化管示意图

1. 表皮 2. 氢氧化钾溶液 3. 橡皮塞
4. 橡皮管 5. 盛水的烧杯

到160℃，保持15—20分钟，由于体壁的大部分组织在高温下被强碱消化，几丁质上乙酰基被脱去，剩下透明薄膜状的几丁糖。

3. 将各消化管内未消化的物质倒入小培养皿中，并用镊子将其逐步移入95%，70%，50%，30%的酒精溶液中清洗，再用蒸馏水冲洗待用。

4. 取一块消化后的蝗虫体壁（几丁糖），置于白磁点滴试验板上，加一滴0.03%碘-碘化钾溶液，再加一滴1%硫酸，几丁糖立即产生紫褐色反应。如再加上数滴75%硫酸，稍待片刻，紫色变淡，直至消失，表明几丁糖已在浓硫酸作用下完全水解。

5. 另取处理过的蝉蜕、蜚蠊的卵囊外壳和家蚕的卵粒，按“3—4”的步骤同样测试，观察是否有相同结果？

（二）几丁质定量测定

1. 取不同日龄的鳞翅目幼虫数组，每组3—5头，用水清洗体表，剪除头部、尾部和足，再沿腹中线剪开，剔除附着于体壁内的肌肉和脂肪体，用水冲洗干净，再经95%，100%酒精脱水，取体壁约300mg在分析天平上称重。

2. 将已知重量的体壁分别放入消化管中，按上述方法装入消化管，在氢氧化钾饱和溶液中加热消化。

3. 将消化后剩余的几丁糖薄膜细心地倒在滤纸上，用缓慢的流水冲洗干净，然后用95%，100%酒精脱水，称重。按下列公式计算结果：

$$\text{体壁几丁质的相对含量(\%)} = \frac{\text{消化后体壁 (mg)}}{\text{消化前体壁 (mg)}} \times 1.26^* \times 100$$

$$\bullet \text{ 转换系数} = \frac{\text{乙酰氨基葡萄糖分子量}}{\text{氨基葡萄糖分子量}}$$

三、作业与思考

1. 绘制同一龄期不同日龄鳞翅目幼虫（或直翅目若虫）体壁中几丁质含量变化曲线。
2. 记录几丁质定性分析的结果。
3. 表皮几丁质的主要生理功能是什么。

实验三 表皮蛋白质的检测

昆虫表皮的蛋白质种类很多，通常占表皮总重量的50%以上，主要含有二种：一种是与几丁质相结合的多糖蛋白，又称节肢蛋白，另一种是存在于翅肌关节和肌腱表皮内的弹性蛋白，又称橡胶质精。弹性蛋白易被碱性染料选择性地染色，显出亮蓝色，在翅基片、足关节、可活动的刚毛和肌腱等处的表皮中常可检测到亮蓝色的弹性蛋白小点。

本实验的目的和要求是用化学分析法，检测表皮中的蛋白质存在；根据碱性染料对弹性蛋白的选择着色反应，观察其在体壁上的分布位置，了解它在昆虫运动中的生理功能。

一、材料和器具

(一) 供试昆虫 蝗虫或其它昆虫的刚羽化的成虫，家蚕或棉铃虫等鳞翅目幼虫。

(二) 试剂及配制

1. 10%和40%的氢氧化钠溶液。

2. 1%硫酸铜溶液。

3. 浓硝酸。

4. 甲苯胺蓝-亮绿染料 5mg 甲苯胺蓝溶于100ml 0.05mol/L (pH7.0) 的磷酸盐缓冲液中，并加亮绿5mg (亦可用次甲基蓝代替甲苯胺蓝)。

5. 麝香草酚。

(三) 仪器和用具

1. 解剖镜和解剖用具，显微镜。
2. 离心机和匀浆器。
3. 白磁点滴试验板，试管和滴瓶。

二、内容和方法

(一) 表皮蛋白液制备 取家蚕或粘虫等鳞翅目幼虫的体壁，刮去皮细胞，仅留表皮，剪碎放入匀浆器内，加水（每头幼虫1ml）研磨，然后离心10分钟（4000转/分），将上清液倒入瓶中待用。

(二) 蛋白质定性

1. 双缩脲反应 取1—2ml表皮蛋白液，加等体积10%氢氧化钠溶液，摇匀，再加几滴1%硫酸铜，溶液即呈浅红-蓝紫色，此为蛋白质中多肽的显色反应。

2. 黄蛋白反应 取家蚕体壁一块，剔除肌肉和皮细胞，用水洗净，放在白磁点滴试验板上，用吸水纸吸去水分，加一滴浓硝酸，表皮呈黄色，如再加一滴40%氢氧化钠，表皮由黄色变为橙黄色，表明表皮蛋白中含有带苯环的氨基酸，如酪氨酸和色氨酸等。

(三) 弹性蛋白的显色反应

1. 将刚羽化的活成虫浸入95—100℃的磷酸盐缓冲液中（pH7.0）数分钟，然后解剖虫体，移去内部器官和柔软部分，将体壁放在一薄层自来水中冲洗干净。

2. 将冲洗过的表皮移入甲基苯胺蓝-亮绿染液中，在室温下染色24—48小时，并加入麝香草酚结晶一粒，以防止微生物污染。

3. 染色完毕，将表皮移入新鲜缓冲液中漂洗数小时，在显微镜下检查，表皮中呈现很多半透明亮蓝色小点，即为弹性蛋白。

三、作业与思考

1. 昆虫表皮中有哪几种主要蛋白质？说明其功能。
2. 绘图示意弹性蛋白在表皮上分布的位置。

实验四 蜕皮腺结构和脱皮行为的观察

蜕皮腺是由真皮细胞转化而成的腺体。小地老虎、家蚕、粘虫和棉铃虫等鳞翅目幼虫共有15对蜕皮腺，其中12对位于胸部1—3节和腹部1—9节背侧面，其余3对位于前、中、后胸基节窝外侧。腺体呈囊状，由一个大型的分泌细胞和两个小型的导管细胞组成。脱皮前分泌细胞膨大，充满蜕皮液，脱皮时通过导管口排放蜕皮液于新旧表皮之间。蜕皮液除了由蜕皮腺分泌外，还可能由皮细胞直接分泌，具有消化旧表皮、运载消化产物和作为脱去旧表皮的润滑剂等功能。

昆虫的脱皮是一个复杂的过程：皮层溶离→新表皮沉积→旧表皮溶解和被吸收→脱皮→新表皮鞣化和暗化→新表皮继续沉积。

本实验的目的和要求是观察鳞翅目幼虫蜕皮腺的位置、形态和组织结构及其脱皮前后的变化；了解脱皮过程中昆虫的行为反应，体壁结构的特点，以及“蜕”的形态。

一、材料和器具

(一) 供试昆虫 小地老虎（或家蚕、粘虫）等脱皮前后的老龄幼虫，以及预蛹。

(二) 仪器及用具