

检压技术的应用

刘桂德 张自強 骆苏芳

赠阅

编 著

5-3
1011

成都科技大学出版社

Q5-3
LGD

Yx111/12
检压技术的应用

刘桂德 张自强 骆苏芳

编 著

成都科技大学出版社

责任编辑：黄 震

封面设计：夏光明

检 压 技 术 的 应 用

刘桂德 张自强 骆苏芳 编著

成都科技大学出版社出版发行

电子科技大学 印刷厂印刷

开本787×1092 1/32 印张3.75 字数75千字

1991年6月第1版 1991年6月第1次印刷

印数1—1500册

ISBN 7-5616-0789-X/R.22

定价：2.00元

前 言

华勃仪检压技术是用于动物、植物离体细胞呼吸功能以及亚细胞成分和各种酶的活力的研究，属该方面的经典方法之一，多年来一直在应用并有发展。这是因为它具有特有的优点，如灵敏度高、精确性好、价格不昂贵等。本书作者们积几十年有关工作的经验，就其基本理论，实际操作和几个方面的应用进行了细致的阐述。可供生物、药理、生化、毒理、农化、植化等从事有关工作者的参考，有其实用意义。

周廷冲 阎敬初

（军事医学科学院药理学教授）

编 者 的 话

检压技术是现代生物科学研究工作中的一项极有价值的科研手段，超过生化实验常用的比色法。且国产品比进口品并无逊色，任何科研单位只需花很少资金便可购置一台，供长期使用。

书中部分成果曾获得过科研成果奖及进步奖。但由于编者等的水平有限，谬误之处在所难免，希望各位专家、同行和读者们批评指教。第一军医大学吴晓恒副校长和成都科技大学出版社靳思源同志大力支持本书出版，以及军事医学科学院周廷冲教授和阎敬初教授等审阅，甚谢！

编 者

一九九〇年十一月

目 录

第一章 华勃检压仪的结构、原理和使用方法·····	(1)
一、华勃仪的结构·····	(1)
二、华勃反应瓶常数·····	(2)
三、容器常数测定方法·····	(8)
四、华勃仪操作与读数法·····	(10)
五、组织细胞制备法·····	(13)
附录 汞的清洁法·····	(15)
第二章 测定动、植物细胞的呼吸功能·····	(18)
一、豚鼠心肌薄切片的呼吸功能测量·····	(19)
二、药物对豚鼠心肌薄切片呼吸耗氧量的影响·····	(21)
三、豚鼠腹腔注入药物后心肌薄切片耗氧量的 变化·····	(21)
四、中药(草药) 注射剂对豚鼠心肌耗氧量 的影响·····	(25)
五、讨论·····	(27)
第三章 谷氨酸脱羧酶和沙林分解酶等的活力测定···	(30)
一、大白鼠大脑谷氨酸脱羧酶的活力测定·····	(31)
二、药物对大白鼠大脑匀浆谷氨酸脱羧酶活力的 影响·····	(33)
三、沙林分解酶的活力测定·····	(34)
四、琥珀酸的脱羧作用·····	(36)
第四章 心肌细胞线粒体的提取及其呼吸功能·····	(39)

一、心肌细胞线粒体的提取.....	(39)
二、心肌细胞线粒体耗氧呼吸效应.....	(41)
三、 β -受体阻滞剂对线粒体耗氧效应的 影响.....	(42)
第五章 胆碱酯酶的功能与其抑制剂和复活剂的作用机理及 胍类药物对体外胆碱酯酶活力的影响.....	(46)
一、胆碱酯酶的功能.....	(46)
二、AChE抑制剂 (抗AChE 药)	(48)
三、AChE抑制剂中毒的机理.....	(48)
四、AChE复活剂 (AChE重活化剂)	(49)
五、便于体外进行实验观察的胆碱酯酶.....	(50)
六、胆碱酯酶复活剂体外对酶活力的抑制 作用.....	(53)
第六章 氯磷定替代解磷定的条件及其对梭曼中毒的家兔大 脑胆碱酯酶系统的影响.....	(56)
一、氯磷定与解磷定对有机磷中毒家兔全血 胆碱酯酶复活作用方面的比较.....	(56)
二、氯磷定与解磷定对动物毒性方面的比较.....	(57)
三、两药分别经理化条件处理后对溶液 pH的影响.....	(58)
四、两药经上述高热、高压及酸碱处理后对 中毒酶复活作用的比较.....	(58)
五、讨论.....	(59)
第七章 胆碱酯酶测定技术的改进与对哺乳 动物及菜园工人全血胆碱酯酶活力的 检测.....	(61)

一、利用检压法测定AChE的原理.....	(61)
二、对检压法测定AChE活力方法的改进.....	(61)
三、试管血样与滤纸片保存血样的酶活力 比较.....	(63)
四、利用检压法对人及其它哺乳动物全血 胆碱酯酶活力的测定.....	(64)
五、菜园工人与正常机关工作人员全血胆 碱酯酶活力的比较.....	(65)
第八章 羟胺比色法的改进及对有机磷酸酯类 中毒动物组织胆碱酯酶的测定.....	(68)
一、羟胺比色法在操作中的改进.....	(68)
二、羟胺比色法本身的误差范围.....	(70)
三、比色法与检压法的比较.....	(70)
附录 半数有效量测定法.....	(72)

第一章 华勃检压仪的结构、 原理和使用方法

华勃仪(Warburg's apparatus)是德人 O. Warburg 于 1926 年创制的。它是用来研究动物和植物离体细胞呼吸功能以及亚细胞成分或各种酶的活力等所应用的仪器。

一、华勃仪的结构 [1], [2]

华勃反应瓶 (reaction flask) 的容量有 15 和 20 毫升两种。瓶侧有一个或两个侧臂 (side arm) 又称侧瓶 (side flask), 其容量小于 1 毫升。侧臂上的玻璃瓶塞 (stopper) 具有一个通气孔。主瓶 (main flask) 内中央位置有一中央 (心) 小杯 (central cup), 用来盛碱液, 常用 1~20% KOH 0.2 毫升, 小杯内放一滤纸小片, 纸面积为 2 厘米×2 厘米, 并摺叠成风箱形, 插入小杯使滤纸在小杯上沿露出约 5 毫米。此滤纸片和碱液是用来吸附细胞呼出的二氧化碳的。

检压计亦称压力计 (manometer), 成 U 字形, 其一枝侧管与反应瓶相联, 称闭管, 另一枝侧管与外界相通, 称开管。闭管上端有一个三通活塞 (3-ways' stopper)。检压计下端有一开口, 联接约 10 厘米长的橡皮管, 橡皮管的下口用一短玻棒闭塞住, 橡皮管内盛 Brodie 氏液, 此橡皮管即称贮液囊。Brodie 氏液起初装入的高度应到达检压计的约 100 毫米处。贮液囊用一固定螺旋来加压调节 Brodie 氏液液柱高度和读数。读数时使闭管内液面达到 150 毫米处 (零点), 即

读开管液面达到的毫米位置。检压计的开管和闭管均有相同的毫米刻度，最下为0，最上为300毫米；另有以中点为0，最上为+150，最下为-150毫米的（图1-1）。亦有500毫米刻度的检压计。

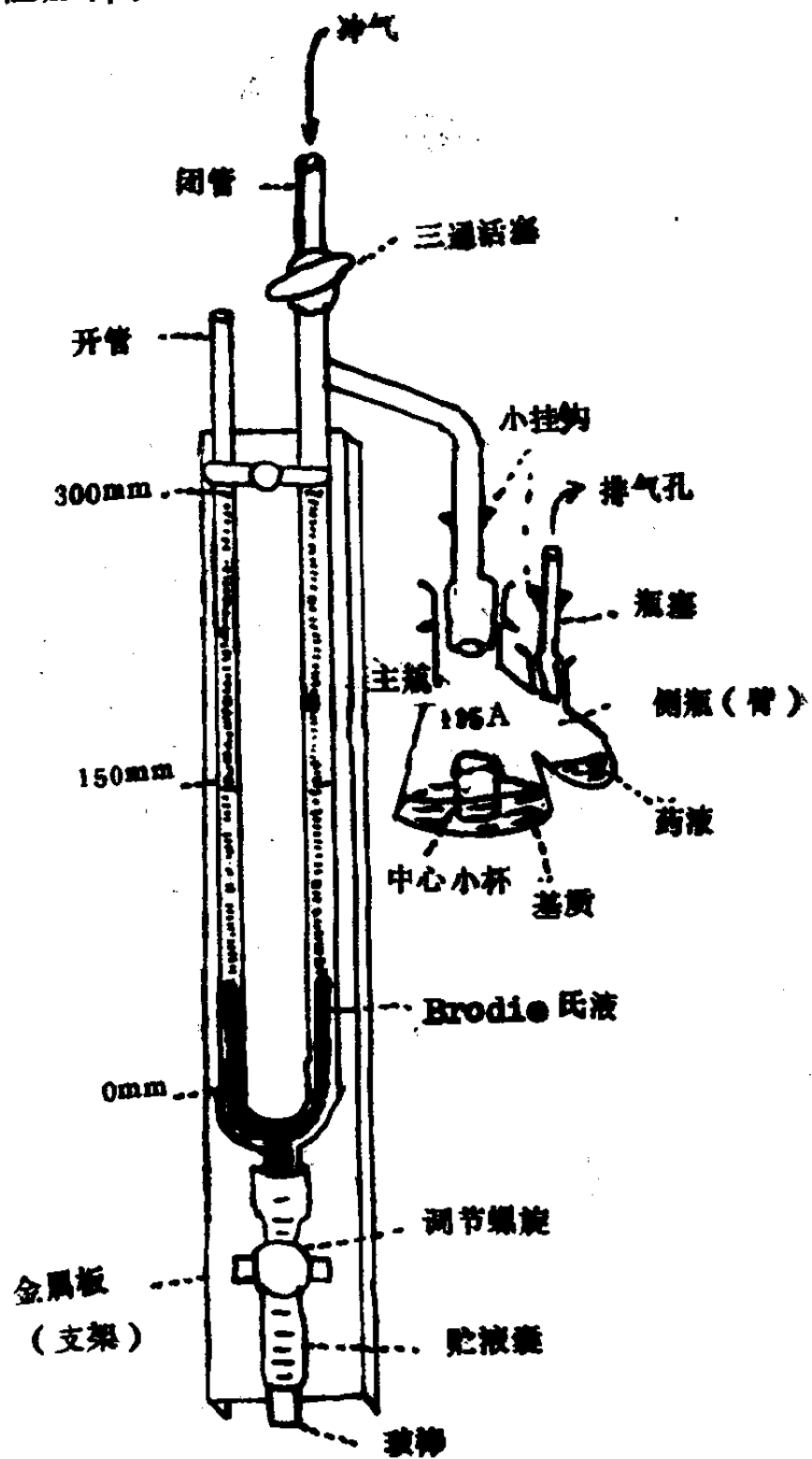


图1-1 华勃检压计与反应瓶

反应瓶和检压计的联接口，侧臂和瓶塞的接口，以及三通活塞和闭管上端的接口等处，都是磨砂玻璃面，须加用凡士林或羊毛脂均匀涂布，当接合上这些磨砂玻璃面后应稍稍旋转，使接触面外观呈透明发亮时，才算严密，须注意不让凡士林堵塞侧臂和瓶塞上的通气小孔。每次实验完毕，即卸下侧臂的瓶塞和反应瓶，用纱布或棉花浸以汽油或热水来清除掉玻璃上的凡士林。每一套反应瓶、瓶塞和检压计不可互换乱配，须用氢氟酸或用金刚石玻璃笔在以上三件玻璃上刻字编号。一般为一个检压计配两套反应瓶和瓶塞，可分别编刻 $\times\times A$ 和 $\times\times B$ 。反应瓶与检压计接口处各有两个玻璃小挂钩，用小钢丝螺旋弹簧来挂联或用橡皮圈拉紧来联接；侧臂及瓶塞上也有小挂钩，同样可用钢丝弹簧或橡皮圈来联接拉紧（亦有无挂钩的）。

反应瓶清除残留凡士林后，泡清洁液（重铬酸钾+硫酸）几小时，后用自来水冲洗四次和蒸馏水冲洗二次，经烤箱烘干后再用。侧臂的瓶塞只须用纱布擦干凡士林后即可再用；检压计和瓶塞均不必清洗。检压计中的 Brodie 氏液亦不须更换，但时间太久，如几周以后，应放出 Brodie 氏液，另更换新液，因长时蒸发水分后溶液比重起了变化。

新购置的检压计常因玻璃太髒，须加清洗，最好用抽气水泵抽丙酮及蒸馏水清洗；如用清洁液浸泡后烤干，应注意烤时温度不宜太高，以免使刻度和容量发生变化。刻度如因清洗而脱色时用蜡笔重新染色，才便于读数。

恒温水浴锅呈长方形或圆筒形，用汞恒温计（mercury thermostat）和继电器控制恒温。振荡器用马达驱动，以电位器控制振速，振速以100~120次/分较好，振幅以2~

3厘米为宜。圆筒形溶锅的振荡器是沿检压计中轴左右旋转的，而长方形溶锅的振荡器是左、右摆动，故前者读数时可不必停车，后者必须停车后才能读数。

反应瓶内液相面积小，气相的氧渗入较慢，振荡速度应快，但注意不可太快，以免碱液自中心小杯溢出进入主瓶。细胞总量以100~400毫克为宜，如超过400毫克时，振荡速度将影响细胞的耗氧量，即振荡快者吸氧量多，慢者吸氧量少（图1—2）。

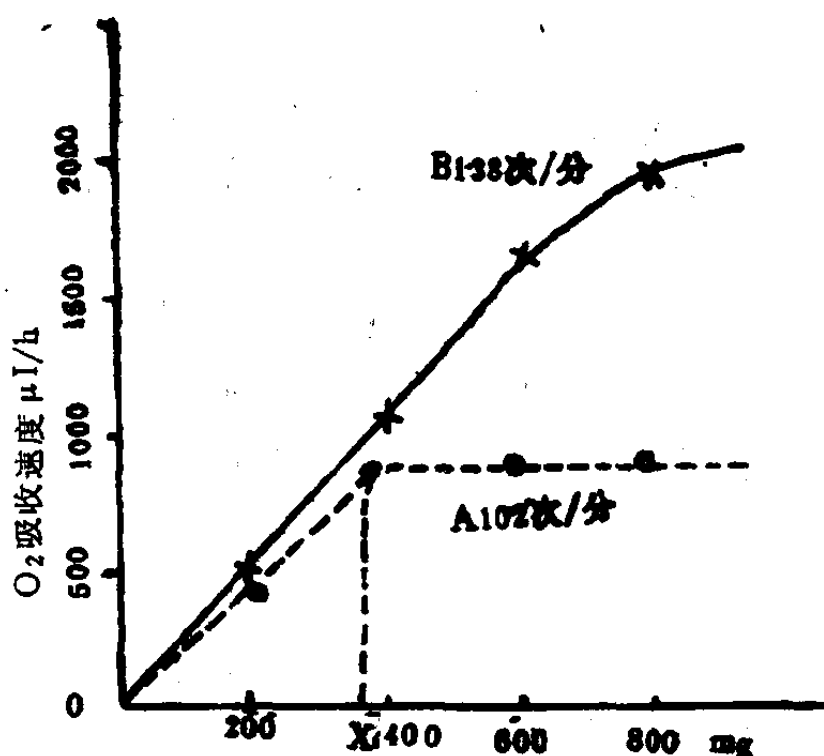


图1—2 酵母细胞吸氧量与振荡速度的关系

二、华勃反应瓶常数 (k) [8]

华勃反应瓶常数 k 代表某一呼吸计（检压计加反应瓶）

在一定温度时，压力计上每 1 毫米的变化（增或减）所表示的气体增加或减少的量。

$$\text{公式: } k = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha}{P_0}$$

所有的容积都用微升（ μl ）或立方毫米（ cmm ）；

检压计上刻度即读数都用毫米（ mm ）；

气体容量都为干燥气体在标准状态（N.T.P.即 0°C ，1 大气压）下的微升或立方毫米值；

V_g = 反应瓶及压力计内至 150 毫米处的气相总容积（ μl 或 cmm ）；

V_l = 反应瓶中液相的总容积（常用 1.5~2.5 毫升），应算成微升；

T = 水溶的绝对温度（ $273^\circ + t^\circ\text{C}$ ）；

α = 所产生或吸收的气体在反应瓶内液相中的溶解度（标准状态下气体的微升量），即气体分压为 P_0 （=760 毫米汞柱）时，在 1 微升液体中该气体的溶解量（微升）；此 α 值可在物理常数表上查到（表 1—2）。

P_0 = 760 毫米汞柱的标准气压换算成 Brodie 氏液应有的毫米高度，指定 $P_0 = 10,000\text{mm}$ ；

根据公式： $P_0 \times D = 760 \times 13.6$

$$\text{则 Brodie 氏液的密度 } D = \frac{760 \times 13.6}{10,000}$$

$$= 1.033$$

p = 水溶温度为 T 时的水蒸气压力；

X = 在标准状态下所产生或吸收的气体量（微升），产

生为正，吸收为负；

h = 检压计上读数（毫米）的实际改变数。

将实验开始前（即反应发生前）瓶中气体量换算成标准状态的量（ V' = 标准状态时的气体容积）。

依公式：
$$\frac{P \cdot V}{T} = \frac{P_0 \cdot V'}{T'} \quad (T' = 273; \text{Boyle-}$$

Gay Lussac)

即
$$\frac{(P-p) \cdot V_g}{T} = \frac{P_0 \cdot V'}{273} \quad (P \text{ 中减去水}$$

蒸气压 p)

则
$$V' = \frac{273}{T} \cdot \frac{P-p}{P_0} \cdot V_g \dots \dots \text{标准状态下瓶中}$$

气相量

实验开始时，气体在液体中的溶解量改变为标准状态下的溶解量，首先应改变液相中溶解量成为标准状态。

$$\therefore V' P_0 = V_l \cdot (P-p)$$

$$V' = V_l \cdot \frac{P-p}{P_0}$$

$$V' = V_l \cdot \frac{P-p}{P_0} \cdot \alpha \dots \dots \text{即气体在 } V_l \text{ 中的溶解}$$

量

实验开始前的气体总量在标准状态下应是瓶中气相量加液体中溶解量之和，

即：
$$\frac{273}{T} \cdot \frac{P-p}{P_0} V_g + V_l \cdot \frac{P-p}{P_0} \alpha$$

$$= \left(\frac{273}{T} V_g + V_l \cdot \alpha \right) \cdot \frac{P-p}{P_0}$$

实验进行之后，检压计上读数改变为 h （毫米，数值增加为正，减少为负）；

$$\text{故最后瓶中气相的容量 } V' = V_g \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{P-p+h}{P_0}$$

同样，溶解在液体中气体的终量

$$V' = V_l \cdot \alpha \cdot \frac{P-p+h}{P_0}$$

终量必然是开始量加产生量（或减吸收量） X 即：

$$\left(V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha \right) \frac{P-p+h}{P_0} = \left(V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha \right) \frac{P-p}{P_0} + X$$

$$\left(V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha \right) \left(\frac{P-p+h-P+p}{P_0} \right) = X$$

$$\left(V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha \right) \left(\frac{h}{P_0} \right) = X$$

$$h \left(\frac{V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot \alpha}{P_0} \right) = X$$

$$h \cdot k = X \quad (h, X \text{ 为正时产气, 负时吸气})$$

一定气体，在一定温度下和一定反应瓶中，其 k 值为一定，称反应瓶常数。由此可知，所产生或吸收的某气体，在干燥和标准状态下的容积是 $X = h \cdot k$ 。

如果气相是空气时， N_2 并不影响 O_2 的分压和溶解度，故 N_2 不变时，只须用 h 乘 k_{O_2} （ O_2 的常数）即得 O_2 的 X 值。

三、容器常数测定方法

最精确的常数测定方法是“汞法”，即是用清洁汞充满反应瓶大约95%的容量，再用滴管（或小塑料管）插入以排除瓶壁上的气泡。将洗净干燥后的检压计接口插入反应瓶瓶口内，汞即上升到检压计接头颈部的某处，用玻璃蜡笔在此汞面处划一标记。取出检压计，把反应瓶中的汞全部倒入烧杯中，务必倒尽，虽剩一小滴汞珠亦须用新毛笔扫入烧杯中。最后在分析天平上称汞重量。

将此检压计倒放，用烧瓶夹夹牢固定在铁支架上，察观接头上蜡笔划线处与检压计闭管的零点（即150毫米）恰好在一个水平面上。取约一厘米长的粗橡皮管套在检压计的瓶口接头上，用滴管吸汞注入此橡皮管和检压计内去。使汞迅速进入检压计，必须使汞柱的一端恰在零点，另一端恰在蜡笔划线处。还须排除汞柱内的气泡。最后，将汞柱全部放入烧杯内，用气球将残余的汞珠打入烧杯中，务必排尽余汞。在分析天平上称汞重量。反应瓶中汞的重量和相配的减压计中汞的重量加在一起。根据当天室温，查汞密度表，计算出汞的

表1—1 不同温度下汞的比重

°C	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	13.5950	5930	5905	5880	5856	5831	5806	5772	5747	5722
10	5698	5683	5658	5634	5609	5584	5560	5535	5511	5486
20	5461	5437	5412	5388	5363	5339	5314	5290	5265	5241
30	5216	5191	5167	5142	5118	5094	5069	5045	5020	4996
40	4971	4947	4922	4898	4873	4849	4825	4800	4776	4751
50	4727	4703	4678	4654	4630	4605	4581	4557	4532	4508
60	4484	4459	4435	4411	4386	4362	4338	4314	4289	4265
70	4241	4217	4192	4168	4144	4120	4095	4071	4047	4023
80	3999	3975	3950	3926	3902	3878	3854	3830	3806	3781

容积(表1—1)。这即是反应瓶加检压计(V_g+V_i)的容器总容积。

反应瓶盛液体的量可选定为2毫升(或1.5, 2.5, 3.0毫升, 此即 V_i 。故 $V_g = (V_g + V_i) - 2,000\mu l$ 。

$$k = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_i \cdot \alpha}{P_0} \quad \text{公式中的 } V_g \text{ 已算出, } \alpha \text{ 查表得}$$

到, P_0 是Brodie氏液在标准状态下的压力(指定 $P_0=10,000$ mm)。T值是水浴温度 $t^\circ C + 273$ 。故k值即可计算出来了。

Brodie氏液的配制法:

NaCl 23克, 胆酸钠(Sod. cholate) 5克; 伊凡氏兰(Evans blue)少量溶于500毫升纯水中, 用比重计测量并调节比重到1.033为止。除了伊凡氏兰外, 其他染料(如复红 Fuchsin red, 甲基兰Methylen blue等)亦可用。牛胆酸钠(Sod. taurocholate)常比胆酸钠易溶解配制。现多用Krebs液代替Brodie氏液, 其配制法如下:

NaBr(无水) 44克, Stergene(Lissapol N) 1克, 伊凡氏兰0.3克, 蒸馏水加至1,000毫升, 在 $20^\circ C$ 调节比重至1.033。

其它任何有机、无机化学药品, 凡能将比重调节并保持在1.033不变者, 均可用做Brodie氏液代替品来应用。

α 值是实验所产生或吸收的气体在水中的溶解度。实验中经常遇到的气体是 CO_2 , N_2 , O_2 和 H_2 , 现将它们在各种温度时的水中溶解度查出列表(表1—2)。

k值为依所做实验为产生气体或吸收气体等不同条件决定的, 如为氧的吸收, 则算得者为 k_{O_2} , 如为二氧化碳产生, 则