

温度对暗适应蛤蚧视杆细胞外段双折射的影响

胡 坤 生

(中国科学院生物物理研究所)

晶体(立方对称的晶体除外)和液晶通常都具有双折射的特性,这是由于结构上的有序性和不对称性产生的。某些生物体结构亦具有双折射现象。其原因有^[1]:组成生物体的原子或分子以及化学键的各向异性,这类双折射称为内禀双折射(intrinsic birefringence)^[2]。组成生物体的细长聚合体或象硬币堆积的扁平片层的定向排列以及由机械应变所产生的双折射,这类双折射称为形状双折射(form birefringence)。从脊椎动物视杆细胞外段的结构来看(图1),它是由细胞质分开的成千个相互平行堆积起来的盘膜组成,并有细胞质膜与外界分隔开。这种结构必具有形状双折射。又根据生物膜结构的流动镶嵌模型^[3],膜上类脂以及蛋白分子的有序排列亦会产生内禀双折射。

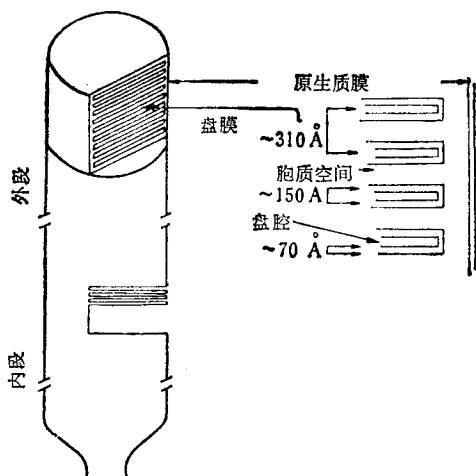


图1 脊椎动物视杆细胞外段模式图

Schmidt^[2]最早报道了脊椎动物光感受器的双折射特性。脊椎动物视杆细胞外段是个光轴平行于视杆长轴的单轴双折射体,也就是说

平行于视杆细胞外段轴的线偏振光的折射率 $n_{\parallel}$ 稍大于垂直视杆细胞外段轴的偏振光的折射率 $n_{\perp}$ 。它的双折射为 $\Delta n = n_{\parallel} - n_{\perp}$ 。视杆细胞外段的双折射由两部分组成:一部分主要是类脂双分子层的碳氢链的有序取向产生的,提取类脂后,这部分双折射将大大降低甚至消失;另一部分是视杆细胞外段盘膜的有序排列引起的,若以与盘膜相近折射率的介质(例如甘油)充填于盘膜之间,则此种双折射将会降低或者消失。在暗适应的视杆细胞外段,通常由类脂分子有序性所产生的正双折射大于由片层有序性所产生的负双折射,所以其总的双折射是正的。蛋白质部分也对双折射有贡献,但其作用比类脂部分小得多^[3]。Liebman^[4]也曾报道了视杆细胞外段的不均匀性对双折射的影响,在20—30 μm 长度的视杆外段的底部双折射的轴向梯度大约为 $2 \times 10^{-5}/\mu\text{m}$ 。很多物化因素亦会影响视杆细胞外段的双折射^[3,5]。Weale^[3]曾经研究了温度对于蛙漂白视杆细胞外段双折射的影响。我们曾研究过温度对于暗适应蛤蚧视杆细胞外段双折射的影响^[6],但由于当时的测量是在温度处理后在室温下进行的,是否存在双折射变化的可逆性尚不清楚。因此本文着重进行即时控制温度对于暗适应蛤蚧视杆细胞外段双折射的影响的测定。

材 料 和 方 法

实验材料为广西所产的蛤蚧。选用蛤蚧作是因为其网膜内只含视杆细胞,并且此种细胞相当大(直径为10 μ 左右,长度为40 μ 左右)。实验前,蛤蚧暗适应12个小时以上,在暗红光下取出视网膜置于千分之八的任氏溶液中。制

成样品后放在偏光显微镜载物台上, 预先调节载物台上的恒温控制器到所需的处理温度, 待样品已达处理温度, 再分别测量不同温度下的蛤蚧视杆细胞外段的双折射。

测量前, 首先调节好偏光显微镜, 寻找、观察以及测量样品的光波长大于 600nm, 否则会引进由二向色性部分带来的程差。二向色性部分的程差与光吸收有关, 并与吸收系数的平方根成正比。由于视杆细胞对大于 600nm 的光吸收极少, 因而二向色性带来的程差可以忽略, 其测量程差主要由双折射的程差决定^[7]。长波测量的另一个好处是可以避免视杆细胞外段的漂白, 因为漂白会使视杆细胞外段的双折射升高。在偏光显微镜下首先找到游离的完整的视杆细胞外段 (图 2), 并把它调节到处于目镜十字标尺线的一、三象限内成 45° 夹角, 起偏振器和检偏振器处于正交状态, 这时可见暗背景下的亮视杆细胞外段, 然后调节旋转云母补偿器进行测量。



图 2 显微镜下的游离完整的蛤蚧视杆细胞外段 (×800)

单个视杆细胞外段仅有 10^{-3} 数量级的微弱双折射。为了测量如此小的程差 (双折射等于程差除以视杆细胞直径), 我们采用了 0.03λ 的旋转云母补偿器, 并使用了视场匹配法进行测量^[8,9]。即调节补偿器使视杆细胞外段在偏光显微镜下的亮度与周围背景的亮度相同, 这样就消除了仪器本身带来的残余程差。因为在小程差测量中, 仪器的残余程差将会严重影响样品双折射的测量。若补偿器的程差为 $R_{\#}$, 仪器的残余程差为 R_{α} , 视杆细胞外段产生的程差为

$R_{\#}$, 在测量中是三个程差的共同结果, 输出的光强有下列关系式:

$$I = I_0(R_{\#} + R_{\#} \sin 2\epsilon + R_{\alpha} \sin 2\phi)^2 \quad (1)$$

若补偿器放在 ϵ_1 , 输出光强 $I = 0$ 则

$$R_{\#} \sin 2\epsilon_1 = -R_{\alpha} \sin 2\phi \quad (2)$$

当匹配法进行测量时, 旋转云母补偿器放在 ϵ_2 , 即视杆细胞外段与背景一样亮, 即 $I_{\#} = I_{\#}$, 则

$$(R_{\#} \sin 2\epsilon_2 + R_{\alpha} \sin 2\phi)^2 = (R_{\#} + R_{\#} \sin 2\epsilon_2 + R_{\alpha} \sin 2\phi)^2 \quad (3)$$

合并(2)与(3)式解方程式则得:

$$R_{\#} = 2R_{\alpha}(\sin 2\epsilon_1 - \sin 2\epsilon_2) \quad (4)$$

从方程式 4 中可知, 由于使用了匹配法, 视杆细胞外段的双折射仅仅与补偿器有关而与仪器残余程差无关了。

实验结果

每种温度下, 在不同的蛤蚧视杆细胞外段样品标本中, 选 5 个以上进行双折射测量, 每个视杆细胞外段测量三次, 取三次测量的平均值, 然后再取这种温度下 5 个视杆细胞外段双折射的平均值。把 0.03λ (测量波长 600nm), 视杆细胞直径以及达到匹配时的补偿器读数代入公式:

$$\Delta n = -2R \sin 2\epsilon / d^{[4]}$$

计算出视杆细胞外段的双折射。Δn——视杆细

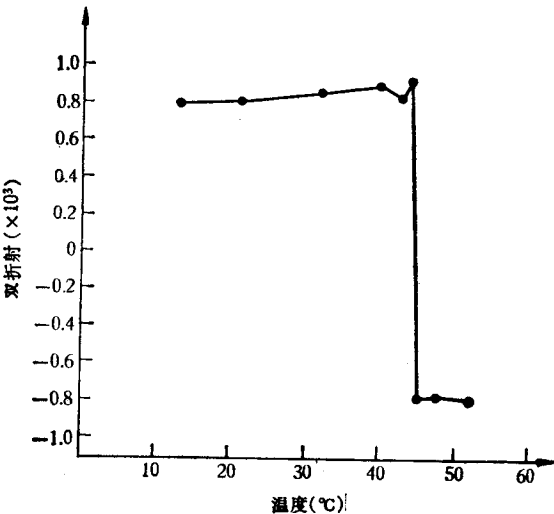


图 3 温度对于暗适应蛤蚧视杆细胞外段双折射的影响

胞外段的双折射, R ——补偿器的程差(0.031), d ——视杆细胞的直径, θ ——起偏振器轴和补偿器慢光方向之间的夹角, 即补偿器读数与45度之差。若补偿器读数小于45度则视杆细胞外段具有正的双折射, 若补偿器读数大于45度则视杆细胞外段具有负的双折射。暗适应蛤蚧视杆细胞外段的双折射和温度之间的关系如图3所示, 从图3可知, 温度低于44℃时, 暗适应蛤蚧视杆细胞外段的双折射为正值, 并且在13°—44℃之间没有明显的变化, 当温度高于45℃时, 暗适应蛤蚧视杆细胞外段的双折射变为负值, 在45°—52℃之间也没有发现明显的差别。

讨 论

从即时温度控制下的双折射测量结果与温度处理后在室温下的测量结果^[6]相比较可以得到这样的结论: 1. 温度处理后再回到室温下测量并不存在双折射的可逆变化, 即两种不同的温度处理方式都存在双折射从正变负的转变温度点。2. 温度处理的时间会影响到双折射从正变负的温度点, 在温度处理后(网膜处理时间2分钟)再回到室温下进行双折射测量时, 双折射从正变负的转变温度点为46.5℃, 而在即时温度控制的双折射测量时, 双折射从正变负的转变温度点为44°—45℃之间。

在相同的条件下测量了漂白蛤蚧视杆细胞外段的双折射, 其值为 1.26×10^{-3} , 暗适应的蛤蚧视杆细胞外段的双折射为 $(0.8-0.9) \times 10^{-3}$, 因此漂白能使双折射升高。我们还测量了青蛙视杆细胞外段的双折射作为对照, 发现温度处理后暗适应青蛙视杆细胞外段的双折射也存在

一个从正到负的转变温度点(50℃), 它略高于蛤蚧的双折射从正变负的转变温度点。

产生视杆细胞外段双折射的原因是由于视杆细胞外段结构的各向异性, 其结果存在两个不同的折射率 $n_{\parallel}$ 和 $n_{\perp}$, 在光线通过视杆细胞外段过程中, 两光线之间就有程差 $R_{\text{杆}}$ 存在。所以双折射的变化一定反映了结构有序性的变化。我们测量的结果是形状双折射和内禀双折射的共同结果。加热蛤蚧视杆细胞外段至52℃, 从亚显微结构观察中没有发现片层结构的明显混乱, 所以形状双折射不会有很大变化, 而高于45℃温度处理后, 可能垂直于盘膜表面的类脂分子排列混乱, 消失了有序性, 从而使正的内禀双折射大大降低或者甚至消失, 因此表现出负的双折射性质。必须指出的是无论是温度还是光漂白对于双折射影响的机理问题, 目前尚不清楚, 我们的讨论只是一些设想而已, 有待于进一步实验证实。

蔡之慎同志参加了部分工作, 在此表示感谢

参 考 文 献

- [1] Singer, S. J. and Nicholson, G.: *Science*, **175**, 720, 1972.
- [2] Schmidt, W. J.: *Kolloid-Z*, **85**, 137, 1938.
- [3] Weale, R. A.: *Pflügers Arch.*, **329**, 244, 1971.
- [4] Liebman, P. K.: *Biophysical Journal.*, **23**, 59, 1978.
- [5] Weale, R. A.: *The Journal of Physiology*, **210**, 28, 1970.
- [6] Tan Man-Qi, et al.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **68**, 277, 1981.
- [7] Weale, R. A.: *Experientia*, **27**, 403, 1971.
- [8] Bear, R. S. and Schmitt, F. O.: *J. Optical Society of America*, **26**, 363, 1936.
- [9] Smith, R. W.: *Vision Research*, **11**, 1383, 1971.

[本文于1983年1月3日收到]

成就的意义不仅在于对进一步开展哺乳动物的遗传工程研究有所启示, 并可为研究生长激素的生物作用和某些遗传疾病如巨人症提供了实验模型, 而且也为将此技术用于加快有经济价值的动物生长提供了可能。

摘自 *Nature* **300** p611. p675(1982. 12, 16 情)

(上接第77页)

常小鼠。这种超级小鼠的特点是生长速率较同窝正常小鼠快, 74天时体重即接近于同窝正常小鼠的二倍; 肝脏中融合 mRNA 的水平很高, 有些超级小鼠血清中生长激素 GH 水平可及正常小鼠的 100—800 倍。这一