



УДК 577.3 : 576.8.095.14

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ
ПРЕВРАЩЕНИЙ БАКТЕРИОРОДОПСИНА В ПУРПУРНЫХ
МЕМБРАНАХ И КЛЕТКАХ *HALOBACTERIUM HALOBIVM*
МЕТОДОМ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ*

Литвин Ф. Ф., Балашов С. П., Синещиков В. А.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Обнаружена слабо зависящая от температуры быстрая фотохимическая реакция бактериородопсина, приводящая к образованию фотопродукта с максимумом при 600 нм (Р600) (квантовый выход $\geq 0,2$ при -190°). Фотореакция полностью обратима под действием красного света. Фотопродукт Р600 устойчив в темноте при -190° , но при повышении температуры до -140° , самопроизвольно превращается в продукт Р550, при дальнейшем нагревании до -80° образуется продукт Р415. Р550 и Р415 при температурах выше -80 и -50° соответственно претерпевают темновые превращения с регенерацией исходного родопсина, аналогичные обратные переходы наблюдаются и под действием света. Последовательность спектральных сдвигов, температурные границы устойчивости и другие свойства реакций бактериородопсина аналогичны превращениям родопсина животных в ходе зрительного процесса и в некоторых чертах сходны с превращениями фитохрома. Фотореакция бактериородопсин \rightarrow Р600 интерпретирована как *цис-транс*-изомеризация ретиналя. Особенностью бактериородопсина является его способность к многократным циклическим превращениям даже при отрицательных температурах.

Галофильные бактерии *Halobacterium halobium* привлекли внимание исследователей как весьма необычные организмы, не содержащие хлорофилла и в то же время, по мнению ряда авторов [1—8], способные осуществлять накопление энергии квантов, поглощаемых бактериородопсином — аналогом основного зрительного пигмента [9, 10].

Однако фотохимические реакции, составляющие основу механизма действия бактериородопсина, изучены мало. Имеются, в частности, немногочисленные работы, выполненные с использованием абсорбционной спектрофотометрии и флеш-фотолиза [1, 9—13]. В них обнаружены два типа изменений спектра поглощения, которые наблюдали при освещении пурпурных мембран, выделенных из клеток и содержащих комплекс бактериородопсина. Одно из них описывается как смещение максимума поглощения бактериородопсина от 558 к 570 нм, медленно обратимое в темноте и связанное, как полагают, с *цис-транс*-фотоизомеризацией ретиналя [9, 12]. Другое изменение — быстро обратимое выцветание основной полосы бак-

* Промежуточные продукты (Р) реакций бактериородопсина обозначаются путем указания их максимума поглощения, положение которого оценено по разностным спектрам с учетом перекрытия полос поглощения; Р570 обозначает исходный бактериородопсин (смесь двух его форм с максимумом поглощения в интервале 560—570 нм при 20° и 566—574 при -190°).

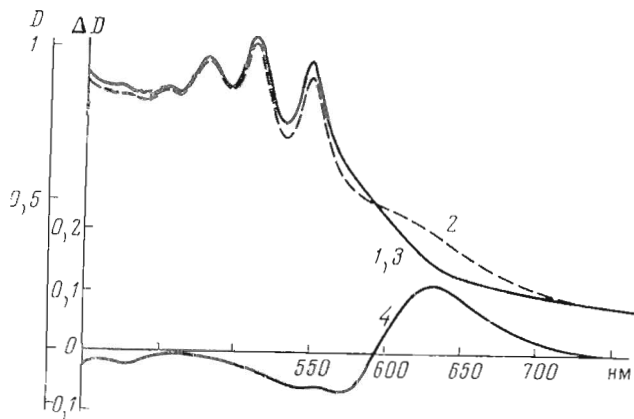


Рис. 1. Фотондуцированные изменения поглощения суспензии бактерий при -190° : 1 — спектр поглощения бактерий, замороженных в темноте (перед опытом бактерии находились на свету); 2 — то же, но образец освещен при -190° 30 с светом 540 нм; 3 (совпадает с кривой 1) — то же, что и 2, но образец дополнительно освещен 30 с светом 680 нм; 4 — разностный спектр (кривая 2 минус кривая 1)

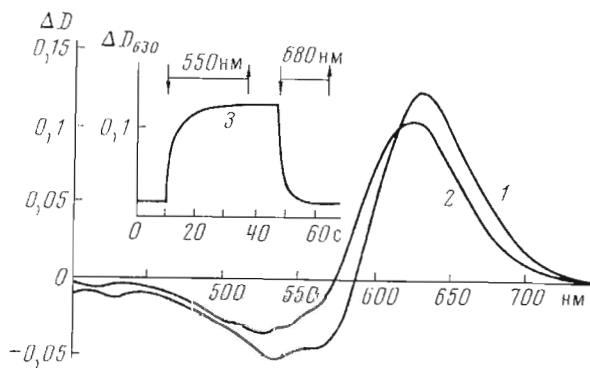


Рис. 2. Фотондуцированные изменения поглощения пленки пурпурных мембран при -190° : 1 — разностный спектр «свет минус темнота» образца, освещенного при -190° 30 с светом 540 нм, перед замораживанием образец освещен при 20° 2 мин светом 400—550 нм; 2 — то же, что и 1, но перед замораживанием образец выдержан 48 ч в темноте при 20° ; 3 — кинетика изменения оптической плотности при 630 нм под действием света 540 и 680 нм (↓ — включение действующего света, → — выключение)

териородопсина, которое сопровождается появлением компонента, поглощающего при 412—415 нм [1, 11, 13]. При охлаждении суспензии клеток в процессе освещения максимумы в разностном спектре быстрой реакции сохраняются. Эту реакцию связывают с основной фотосинтетической функцией бактериородопсина.

Для выяснения характера и природы первичных фотохимических реакций бактериородопсина, протекающих при освещении клеток и мембран, представляется перспективным изучение фотондуцированных изменений спектров поглощения в широком температурном интервале вплоть до глубокого охлаждения объекта (4°K).

При комнатной температуре в суспензиях бактерий и сухих пленках из пурпурных мембран оказалось возможным наблюдать спектральные

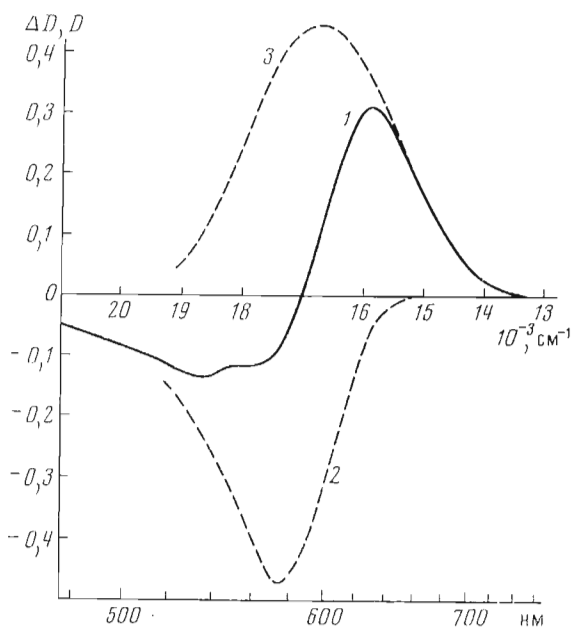


Рис. 3. Разложение разностного спектра низкотемпературной фотореакции на индивидуальные компоненты: 1 — разностный спектр «свет минус темнота» пленки, освещенной при -190° светом 540 нм, перед замораживанием образец освещен при 20° 2 мин светом 400—550 нм; 2 — полоса поглощения исходного вещества; 3 — полоса поглощения продукта фотореакции

эффекты, обнаруженные ранее на суспензиях мембран [9, 1, 11]. Кроме того, нами было замечено небольшое, быстро обратимое в темноте фотоиндуцированное увеличение поглощения в области 650—720 нм. Это изменение отчетливо проявляется при низких температурах.

Фотопревращение P570 → P600 под действием света 400—600 нм при -190° . Освещение суспензий клеток, мембран и сухих пленок в указанных условиях сопровождается смещением главного максимума бактериородопсина от 574 к 578 нм, уменьшением поглощения в области основной полосы бактериородопсина и увеличением поглощения в области 590—740 нм (положительный максимум в разностном спектре «свет минус темнота» — 630 нм, изобестическая точка ~ 588 нм, см. рис. 1 и 2). Образовавшийся фотопродукт при данной температуре устойчив; после выдерживания освещенного образца в темноте в течение 1 ч не удается обнаружить изменений поглощения с точностью до $2 \cdot 10^{-3}$ ОЕ.

Вследствие сильного перекрытия полос поглощения превращающихся веществ положение максимумов в разностном спектре (измеряемое с точностью до 2 нм) заметно отличается от их истинного положения. Для определения полуширины полос и действительного положения максимумов требуется разложение разностных спектров на компоненты, при этом точность определения понижается [14]. В предположении, что полоса фотопродукта симметрична, можно оценить положение максимумов поглощения исходного вещества (570—580 нм) и фотопродукта (600—610 нм) (рис. 3). Исходное для фотореакции вещество (P570), по-видимому, представляет собой основную массу бактериородопсина, тогда как фотопродукт (P600) — его измененную форму, для которой характерен сильный батохромный эффект (~ 30 нм) и большая (~ 100 нм) полуширина полосы поглощения. Наличие дополнительной структуры разностного спектра в области 500—580 нм (рис. 3) и форма длинноволновой полосы поглощения

($\lambda > 640$ нм) освещенного при -190° образца указывают на возможное существование других фотореакций, связанных с относительно небольшими изменениями оптической плотности. Возможно, в частности, что структура разностного спектра вызвана фотопревращением компонента пурпурных мембран с максимумом у 530—540 нм, который мало заметен при 20° , но проявляется при -190° в виде широкого плеча на коротковолновом склоне основной полосы поглощения бактериородопсина (при разложении спектра на рис. 3 этот компонент не учитывался).

Существование фотореакции $P570 \rightarrow P600$ было продемонстрировано в широком интервале температур (от -190 до $+20^\circ$) на целых клетках и на различных препаратах мембран, как практически не содержащих каротиноидов, так и на препаратах, содержащих различные количества каротиноидов.

Обратное фотопревращение $P600 \rightarrow P570$ под действием красного света ($\lambda > 630$ нм) при -190° . Если пленку из мембран, предварительно облученную при -190° синим или зеленым светом, осветить красным светом (т. е. в области поглощения образовавшегося фотопродукта $P600$), то в разностном спектре обнаруживается быстрое (~ 5 с) и полное исчезновение максимума 630 нм и одновременное увеличение поглощения в области 400—580 нм. При этом восстанавливается исходный спектр, характерный для неосвещенного образца: действие красного света полностью снимает действие коротковолнового (рис. 1 и 2).

Таким образом, опыты показывают, что при низкой температуре (-190°) протекают две противоположно направленные фотореакции ($P570 \rightleftharpoons P600$), участники которых имеют перекрывающиеся полосы поглощения. Это проявляется и по ряду других свойств, характерных для такого рода фотореакций. Амплитуда фотоиндуцированных изменений после достижения фотостационарного состояния (в наших условиях оно достигалось за время от 5 до 60 с) зависит не от интенсивности действующего света, а от длины его волны. Легко показать, что устанавливающиеся величины оптической плотности D_1 и D_2 превращающихся веществ, взятые при длине волны действующего света, определяются отношением квантовых выходов фотореакций:

$$D_1/D_2 = \varphi_2/\varphi_1.$$

Отсюда, оценивая отношения плотностей, можно заключить, что квантовые выходы фотореакций близки между собой (в соответствии с разложением, представленным на рис. 3, $\varphi_2/\varphi_1 \approx 2$). В случае противоположно направленных фотореакций должна существовать изобестическая точка, положение которой не должно зависеть ни от глубины фотопревращения, ни от интенсивности и длины волны действующего света. Такая точка действительно существует (около 588 нм); незначительное изменение ее положения (± 5 нм) при различном спектральном составе действующего света, возможно, указывает на присутствие других реакций, и, как описано ниже, оно несколько различно для образцов, адаптированных и не адаптированных к темноте при комнатной температуре.

Возникает вопрос: как влияет фотообратимость на протекание процесса при интегральном освещении? В пленках, облученных полным спектром лампы накаливания, фотостационарная концентрация $P600$ достигает примерно $1/3$ от максимальной.

Для оценки эффективного сечения фотохимических реакций и их квантовых выходов измеряли скорость изменения оптической плотности продукта $P600$ на начальном участке кинетической кривой прямой и обратной фотореакции. Экстинкцию бактериородопсина в максимуме (570 нм) при 20° принимали равной $63 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [11]. Расчеты показывают, что при -190° квантовый выход прямой фотореакции не менее 0,2, а обратной — не менее 0,3.

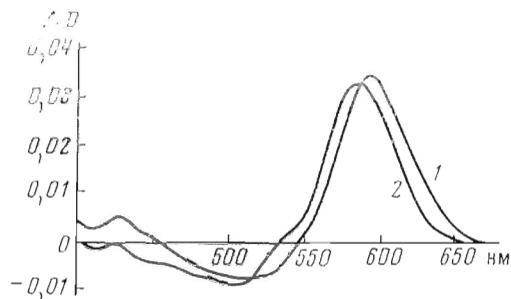


Рис. 4. Фотоиндуцированный сдвиг 560 → 570 при -190° и реакция образования компонента P550 в пленке пурпурных мембран: 1 — разностный спектр «B минус A», где A — спектр поглощения образца, выдержанного 48 ч в темноте при 20° и замороженного до -190° , B — то же, что и A, плюс последовательное освещение при -190° 20 мин светом 400–550 нм и 30 с светом 680 нм; 2 — разностный спектр «A минус B», где A — спектр поглощения образца, освещенного при 20° 2 мин светом 400–550 нм и охлажденного в темноте до -190° , B — то же, что и A, плюс последовательное освещение при -190° 30 с светом 540 нм, нагревание до -120° , возвращение к -190° и освещение 30 с светом 680 нм

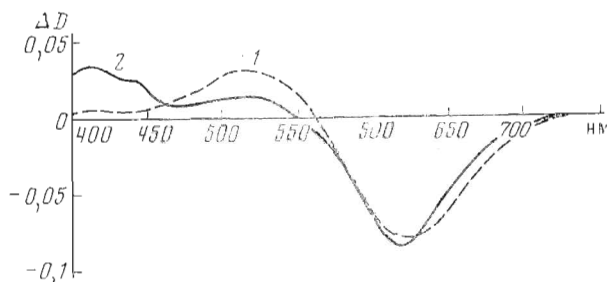


Рис. 5. Темновые превращения продукта низкотемпературной фотореакции (P600) в пленке пурпурных мембран: 1 — разностный спектр «B минус A», где A — спектр поглощения образца, освещенного при -190° 30 с светом 540 нм, B — то же, что и A, но при последующем нагревании до -120° и возвращении к -190° ; 2 — то же, что и 1, но при нагревании до -70°

Описанные выше результаты получены на пленках мембран, предварительно освещенных при комнатной температуре и характеризующихся максимумом поглощения 570 нм при 20° и 574 нм при -190° , который, согласно [12], принадлежит *транс*-изомеру бактериородопсина. Для выяснения соотношения низкотемпературной фотореакции с исследованным ранее смещением спектра (558 → 570), интерпретируемым как результат *цис-транс*-фотоизомеризации родопсина [12], были проведены сравнительные измерения пленок мембран, предварительно выдержанных в темноте при комнатной температуре и характеризующихся максимумом поглощения 566 нм при -190° . Было обнаружено, что все типы описываемых здесь реакций наблюдаются и в пленках, выдержанных в темноте при 20° . При этом разностные спектры несколько отличаются по форме и положению нулевых точек от спектров, полученных на предварительно освещенных при 20° пленках. В разностном спектре низкотемпературной фотореакции нулевая точка смещается на 8–12 нм в коротковолновую сторону (рис. 2). Изменение положения нулевой точки в зависимости от соотношения двух форм бактериородопсина может свидетельствовать о том, что

обе формы обладают способностью участвовать в фотопревращении. В этом случае полная фотообратимость реакций говорит о том, что каждая из них образует свой фотопродукт.

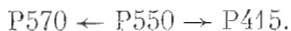
Кроме превращений, характерных для пленок, предварительно освещенных при 20° , в пленках, выдержанных в темноте, при низких температурах (до -190°) наблюдается фотоиндуцированное смещение спектра $566 \rightarrow 574$ (рис. 4). Это смещение, по-видимому, является той же реакцией, что и сдвиг $560 \rightarrow 570$, наблюдаемый при комнатной температуре и интерпретируемый как *цис-транс*-фотоизомеризации бактериородопсина [12]. Скорость реакции сильно зависит от температуры: при -190° она по крайней мере на два порядка меньше, чем при 20° . По сравнению со скоростью фотопревращения $P570 \rightarrow P600$ скорость реакции $566 \rightarrow 574$ при -190° примерно в 10^3 раз меньше.

Прямая и обратная фотореакции $P570 \rightleftharpoons P600$ при температуре жидкого гелия ($4^\circ K$). Освещение зеленым светом пленок пурпурных мембран, замороженных в темноте до -269° , вызывает спектральные изменения, близкие наблюдаемым при -190° (рис. 2); последующее освещение красным светом ($\lambda > 630$ нм) быстро снимает эти изменения. Это свидетельствует о том, что прямая и обратная фотореакции эффективно протекают при температуре, близкой абсолютному нулю.

Темновые превращения $P600$. Продукт $P600$, образующийся из бактериородопсина при освещении пленок коротковолновым светом, устойчив при -190° , но при более высокой температуре претерпевает темновые превращения в более коротковолновые продукты. После нагревания освещенного образца от -190 до $-140 \div -120^\circ$ наблюдается (рис. 5) уменьшение поглощения в области $560-720$ нм (максимум ~ 620 нм) и появляется широкая полоса в области $400-550$ нм с максимумом в разностном спектре при $510-520$ нм ($P550$). При еще более высокой температуре ($-100 \div -60^\circ$) появляется максимум $412-420$ нм, который совпадает по положению с максимумом продукта быстрой реакции, наблюдавшейся ранее [1, 11, 13] при комнатной температуре ($P415$).

В определенных условиях (см. рис. 4) можно избирательно накопить продукт темнового превращения $P550$. При этом разностный спектр образования нового продукта из $P570$ в предварительно освещенных при 20° пленках, взятый с обратным знаком, близок спектру реакции $560 \rightarrow 570$ при -190° (рис. 4). Это свидетельствует о том, что новый компонент имеет полосу поглощения с максимумом в области $540-560$ нм ($P550$).

Если образец, содержащий $P550$ (но не содержащий $P600$), нагреть выше -100° , то можно проследить темновые превращения компонента $P550$. Судя по разностному спектру (рис. 6), при $-100 \div -60^\circ$ происходит темновое превращение $P550$ в $P415$ и в исходную форму пигмента $P570$:



Не исключено, что при температурах $> -100^\circ$ $P415$ может образоваться также непосредственно из $P600$, однако этот путь представляется менее вероятным.

При температуре выше -50° с заметной скоростью начинает происходить темновое превращение продукта $P415$ в исходный родопсин ($P415 \rightarrow P570$) и одновременно уменьшается амплитуда других промежуточных максимумов. Нагревание освещенного при -190° образца до комнатной температуры сопровождается полной регенерацией исходного спектра, свойственного неосвещенному образцу. Аналогичные превращения промежуточных продуктов можно наблюдать и в опытах с выдерживанием предварительно освещенных пленок при фиксированной температуре от нескольких минут до 1 ч (в зависимости от температуры опыта).

Таким образом, опыты показывают, что низкотемпературная фотореакция бактериородопсина $P570 \rightarrow P600$ инициирует целый ряд после-

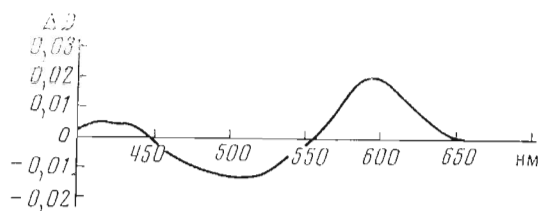


Рис. 6. Темновые превращения компонента P550: разностный спектр «*B* минус *A*», где *A* — спектр поглощения образца, содержащего P550, при -190° (см. подпись к рис. 4, кривая 2, *B*), *B* — то же, что и *A*, но нагретый до -70° и вновь охлажденный до -190°

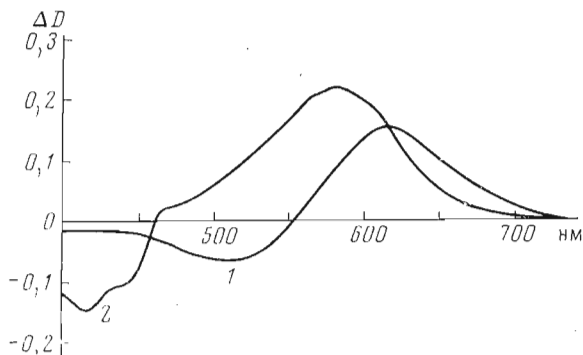
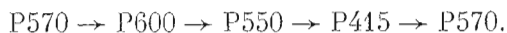


Рис. 7. Фотоактивность промежуточных компонентов P550 и P415: 1 — разностный спектр «*B* минус *A*», где *A* — спектр поглощения образца, освещенного при -190° 30 с светом 540 нм и нагретого до -120° , *B* — то же, что и *A*, плюс освещение при -120° 30 с светом 540 нм (оба спектра измерены при -120°); 2 — разностный спектр «*B* минус *A*», где *A* — спектр поглощения образца, освещенного при -120° 30 с светом 400–550 нм в процессе замораживания от 0 до -70° и охлажденного от -70° до -120° в темноте, *B* — то же, что и *A*, плюс освещение 30 с светом 420 нм при -120° (оба спектра измерены при -120°)

довательных темновых реакций, проявляющихся по возникновению и исчезновению полос поглощения промежуточных продуктов:



Поскольку исчезновение конечного продукта P415 сопровождается полной регенерацией спектра исходного (неосвещенного) образца, процесс в целом можно рассматривать как циклический *. Все стадии могут протекать и при низкой температуре (-40°) в твердой матрице.

Фоточувствительность промежуточных продуктов P550 и P415. Как было отмечено, продукт P415 стабилен при низкой температуре, однако если пленку, предварительно обогащенную этим продуктом, осветить при -120° коротковолновым светом (420 нм), наблюдается уменьшение поглощения при 415 нм и его возрастание при 462–720 нм (рис. 7). Это указывает на способность P415 к фотопревращению в продукт, спектрально близкий (или тождественный) исходному бактериородопсину P570. В бактериях фоточувствительность P415 значительно ниже, чем в пленках из мембран.

* Во время подготовки настоящей работы к печати появилась статья [15] со ссылкой на реферат публикуемой работы [16], в которой на суспензии пурпурных мембран получены данные об аналогичной цепи спектральных изменений бактериородопсина.

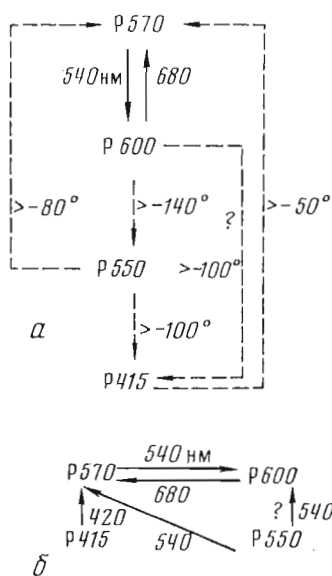


Рис. 8. Наиболее вероятная схема основных световых и темновых реакций бактериородопсина: *a* — основной цикл реакций бактериородопсина; *б* — световые реакции промежуточных компонентов P415 и P550 при -120° (сплошными линиями обозначены световые реакции, штриховыми — темновые)

Промежуточный продукт P550 также, по-видимому, способен к фотопревращениям. Так, при температуре -120° наблюдается его переход в продукт с максимумом в разностном спектре ~ 630 нм (рис. 7), характерным для P600. Это превращение может происходить или непосредственно (P550 \rightarrow P600), или через образование исходной формы бактериородопсина (P550 \rightarrow P570 \rightarrow P600).

Полученные экспериментальные результаты показывают, что первой элементарной фотореакцией превращения бактериородопсина в пурпурных мембранах и клетках является его превращение в длинноволновый продукт: P570 \rightarrow P600. Именно оно дает начало всем последующим превращениям, которые происходят в темноте и проявляются в последовательном перемещении максимумов поглощения в коротковолновую сторону. Фотореакция образования коротковолнового продукта с максимумом ~ 415 нм, описанная для комнатной температуры и постулируемая в качестве основной первичной фотореакции родопсина [1, 11], на основании полученных данных представляется результатом первоначального фотоиндуцированного длинноволнового сдвига P570 \rightarrow P600 и последующих темновых актов. Даже при низкой температуре совокупность превращений бактериородопсина весьма сложна. Она может быть охарактеризована в общих чертах в виде следующей наиболее вероятной, с нашей точки зрения, схемы (см. рис. 8).

На основании полученных результатов пока трудно строить заключения о механизме процессов. Однако представляется несомненной аналогия спектральной картины в ее динамике, а также температурной зависимости спектральных изменений с теми, которые описаны для зрительных пигментов [17, 18]. К чертам сходства относится существование первичной низкотемпературной фотореакции с сильным батохромным эффектом (570 \rightarrow 600 нм для бактериородопсина, 500 \rightarrow 543 нм для родопсина, 550 и 575 \rightarrow 600 нм для иодопсина). Как для родопсина, так и для бактериородопсина образование первичной реакции может происходить под действием света. В обоих случаях превращения, инициируемые первичной фотореакцией, ведут к образованию все более коротковолновых продуктов, при этом величина спектральных сдвигов и температурных пределов устойчивости первоначальных продуктов в общем хорошо сопоставимы. Сходно и свойство температурно-зависимой фотообратимости для реакций промежуточных продуктов. Чтобы говорить о точной аналогии для каждой из стадий двух типов процессов, необходимы более детальные исследования. Однако на основании уже имеющихся данных можно предположить, что P600 является бактериальным прелюмиродопсином. Бактериальным люмиродопсином следует считать P550, а продукт P415 необходимо отнести к бактериальному метародопсину. Если эта аналогия верна, то к отдельным реакциям бактериородопсина может быть приложима интерпретация, развитая для зрительных пигментов (см. [17, 18]). В соответствии с этим первичная фотореакция бактериородопсина (P570 \rightarrow P600) может рассматриваться как *цис-транс*-изомеризация ретиналя, тогда как остальные превращения связаны с изменением всего хромофор-липид-белкового комплекса.

Представленную аналогию и характер первичных процессов в целом трудно согласовать с интерпретацией исходной формы бактериородопсина с максимумом 570 нм как *транс*-изомера [11, 12]. Если хромофором этой формы действительно является полностью *транс*-ретиналь, то его низкотемпературную фотореакцию следует рассматривать как *транс-цис*-изомеризацию. Однако такая возможность представляется нам менее вероятной.

Важно отметить, что регенерация исходного комплекса, которая для зрительных пигментов позвоночных осуществляется с участием фермента, для бактериородопсина может происходить уже при отрицательных температурах темновым или фотохимическим путем (рис. 8).

В целом создается впечатление, что основной комплекс первичных фотохимических и темновых реакций, протекающих в клетке галобактерий под действием света, поглощаемого родопсином, весьма близок к первичному механизму зрения. Если функция бактериального родопсина состоит в накоплении и трансформации энергии квантов (фотосинтез), то возникает вопрос: как объяснить ее столь далеко идущее сходство с механизмом информационного процесса (зрение), в котором поглощение квантов несет не энергетическую, а триггерную функцию? В связи с этой проблемой обращает на себя внимание и общее сходство описанных циклических превращений бактериального родопсина с фотообратимыми низкотемпературными превращениями фитохрома — сенсibilизатора регуляции морфогенетических и фотопериодических процессов (в основе его действия также предполагается существование фотоизомеризации хромофора). Не исключено, что бактериальный родопсин наряду с участием в процессе накопления энергии [1—8] может осуществлять и функцию фоторегуляции различных процессов в клетках бактерий.

Вопрос о механизме первичной фотореакции родопсина также нельзя, как нам кажется, считать окончательно решенным. Прямая и обратная фотореакции, а также обратные темновые реакции бактериородопсина могут быстро протекать при низкой температуре с высоким выходом и скоростью в жесткой матрице. Этот и некоторые другие факты побуждают включить в число возможных механизмов процессы, не связанные с перемещением молекул или групп атомов, например такие фотоэлектронные процессы, как фотоионизация с образованием сольватированного электрона, известная для ароматических соединений, образование ион-радикалов, а также фотоперенос протона. Бактериородопсин представляется весьма удобным объектом для исследования этой проблемы.

Экспериментальная часть

Культуру *Halobacterium halobium* выращивали на среде для галобактерий при 38° и освещенности 4000 лк в условиях ограниченной аэрации.

Пурпурные мембраны выделяли по методике, предложенной ранее [9].

Для оптических измерений использовали водно-глицериновые суспензии (60% глицерина) клеток и мембран.

Пленки из пурпурных мембран получали путем высушивания тонкого слоя суспензии мембран в дистиллированной воде, нанесенного на ровное стекло. Такие препараты даже при длительном хранении обладали фотоактивностью и спектральными характеристиками, свойственными пурпурным мембранам.

Спектры поглощения измеряли на регистрирующем спектрофотометре с интегрирующей сферой (СФ-14). Прямоугольная кювета с суспензией клеток или пурпурных мембран либо покровное стекло с сухой пленкой из мембран помещались в криостат, который позволял регулировать температуру в интервале от -190 до $+20^{\circ}$. Измеряющий свет падал на переднюю плоскость объекта под углом 45° , угол между измеряющим и действующим светом составлял 90° . Для облучения объекта непосредственно

в спектрофотометре использовали лампу накаливания в комбинации с абсорбционными или интерференционными светофильтрами. Интенсивность действующего света 400—550, 420, 540 и 680 нм составляла соответственно $5 \cdot 10^5$, $4 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^4$ эрг/см²·с. Для измерений использовали образцы с оптической плотностью $\sim 0,60$ ОЕ при 570 нм. При повторной записи различия спектров пурпурных мембран не превышали $\pm 0,002$ ОЕ. При работе с бактериями точность измерения и построения разностных спектров была ниже и составляла 0,005 ОЕ.

Небольшие обратимые изменения поглощения и кинетические кривые регистрировали с помощью дифференциального спектрофотометра с чувствительностью $3 \cdot 10^{-4}$ ед. пропускания и постоянной времени 4 с.

Измерения пропускания при температуре жидкого гелия производили в области 450—730 нм по однолучевой схеме на приборе с чувствительностью $2 \cdot 10^{-2}$ ед. пропускания.

Авторы благодарны В. Г. Плакуновой за помощь в работе и консультации, С. А. Остроумову за предоставление препаратов пурпурных мембран, Р. И. Персонову и Е. И. Альшицу за участие в измерениях при температуре жидкого гелия, В. П. Скулачеву и А. М. Шкробу за обсуждение результатов.

Данная работа выполнена в соответствии с программой исследований АН СССР и МГУ «Родопсин», возглавляемой акад. Ю. А. Овчинниковым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Oesterhelt D., Stoerkenius W. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **70**, 2853—2857.
2. Oesterhelt D., Krippahl G. (1973) FEBS Lett., **36**, 72—76.
3. Скулачев В. П. (1974) Успехи соврем. биологии, **77**, 125—154.
4. Danon A., Stoerkenius W. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **71**, 1234—1238.
5. Racker E., Stoerkenius W. (1974) J. Biol. Chem., **249**, 662—663.
6. Kayushin L. P., Skulachev V. P. (1974) FEBS Lett., **39**, 39—42.
7. Drachev L. A., Kaulen A. D., Ostroumov S. A., Skulachev V. P. (1974) FEBS Lett., **39**, 43—45.
8. Барский Е. Л., Драч в Л. А., Каулен А. Д., Кондрашина А. А., Либерман Е. А., Остроумов С. А., Самуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1975) Биоорг. химия, **1**, 113—126.
9. Oesterhelt D., Stoerkenius W. (1971) Nature New Biol., **233**, 149—152.
10. Kayushin L. P., Sibeldina L. A., Lasareva A. B., Vsevolodov N. N., Kostikov A. S., Richireva G. T., Chekulaeva L. N. (1974) Stud. biophys., **42**, 71—74.
11. Oesterhelt D., Hess B. (1973) Eur. J. Biochem., **37**, 316—326.
12. Oesterhelt D., Meentzen M., Schuhmann L. (1973) Eur. J. Biochem., **40**, 453—463.
13. Всеволодов Н. Н., Костиков А. П., Рихирева Г. Т. (1974) Биофизика, **19**, 942—946.
14. Гуляев В. А., Литвин Ф. Ф., Веденев Е. П. (1971) Биол. науки, **4**, 49—57.
15. Lewis A., Spoonhower J., Bogomolni A., Lozier R., Stoerkenius W. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **71**, 4462—4466.
16. Lozier R. H., Stoerkenius W. (1974) Fed. Proc., **33**, 1408, Abstract.
17. Wald G. (1968) Nature, **219**, 800—807.
18. Боровагин В. Л., Островский М. А., Федорович И. Б. (1971) Биофизика, **16**, 350—376.

Поступила в редакцию
26.V.1975

THE INVESTIGATION OF THE PRIMARY PHOTOCHEMICAL CONVERSIONS OF BACTERIORHODOPSIN IN PURPLE MEMBRANES AND CELLS OF *HALOBACTERIUM HALOBIIUM* BY THE LOW TEMPERATURE SPECTROPHOTOMETRY METHOD

LITVIN F. F., BALASHOV S. P., SINESHCHEKOV V. A.

Department of Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow

The fast photochemical reaction of bacteriorhodopsin (maximum absorption at 570 nm), giving formation to a product absorbing at 520—720 nm (P600) under excitation in the region of 400—600 nm, was found in *Halobacterium halobium* cells and dry films

prepared from purple membranes. The photoreaction is weakly dependent on temperature, has a high quantum yield at -190° (not less than 0,2) and is completely reversible under red light. The photoproduct P600 is stable in the dark at -190°C but it turns into a product with a maximum at 540—560 nm (P550) when temperature is raised up to -140°C : at a following heating up to -80°C , a product with absorption maximum at 410—420 nm (P415) is formed. P550 and P415 suffer dark conversions with the regeneration of the spectrum of initial bacteriorhodopsin at temperatures higher than -80°C and -50°C , for the first and the second product, respectively. The dark reactions are photoreversible. The succession of the spectral shifts, temperature limits of stability and other properties of bacteriorhodopsin are comparable with the conversions of animal rhodopsin in visual process and in some features with low temperature phytochrome conversions. The photoreaction bacteriorhodopsin \rightarrow P600 can be interpreted as the *cis-trans*-isomerization of bacterial retinal. The peculiarity of the bacteriorhodopsin reactions is the ability of the pigment to undergo repeated cyclic conversions even at low temperatures.
