



УДК 547.963.4:543.42

ИЗУЧЕНИЕ ИОНОХРОМНЫХ СВОЙСТВ ЗРИТЕЛЬНЫХ
ПИГМЕНТОВ ЦЫПЛЕНКА*Слободянская Е. М., Абрашин Е. В., Островский М. А.**Институт химической физики Академии наук СССР, Москва*

Показано, что иодопсин и родопсин цыпленка обладают разной чувствительностью к анионам хлора. Спектр поглощения родопсина не меняется в присутствии NaCl, тогда как в спектре иодопсина наблюдается bathochромный сдвиг максимума поглощения. Родопсин не переходит в иодопсин при действии NaCl.

В 1937 г. Дж. Уолд [1] обнаружил в дигитониновом экстракте из сетчатки цыплят пигмент, чувствительный к красному свету и названный им иодопсином. Он рассматривал его как зрительный пигмент колбочек. В настоящее время принято классифицировать зрительные пигменты позвоночных и беспозвоночных по структуре хромофора: пигменты, содержащие ретиналь, называют родопсинами, а пигменты, содержащие ретиналь₂, — порфиросинами [2]. В этом смысле палочковый родопсин и открытый Уолдом иодопсин следует отнести к родопсинам. До сих пор не ясно, является ли иодопсин колбочковым пигментом. В частности, высказана точка зрения [3], что иодопсин представляет собой не самостоятельный зрительный пигмент, а лишь спектральную форму родопсина, образующуюся при действии анионов хлора.

В настоящей работе под иодопсином понимается пигмент, чувствительный к красному свету, а под родопсином — пигмент, чувствительный к зеленому. Разная спектральная чувствительность этих пигментов, имеющих в качестве хромофора один и тот же *cis*-11-ретиналь, связана, по-видимому, с различием в их белковых компонентах. Эти пигменты различаются также и по другим физико-химическим свойствам. Например, иодопсин в отличие от родопсина стабилен в значительно более узкой области значений pH, денатурирует при действии квасцов и гидроксилamina [4], обесцвечивается в темноте в присутствии боргидрида натрия [5, 6]. Из этого следует, что хромофорная область иодопсина легче взаимодействует с водорастворимыми агентами. Дигитонин является пока единственным детергентом, в присутствии которого иодопсин достаточно стабилен [6]. Фотоллиз обоих пигментов также проходит неодинаково. Так, иодопсин не переходит в гиссоиодопсин, а образующийся батоиодопсин способен к обратному переходу в иодопсин не только при поглощении кванта света, но и в темноте при температурах вплоть до -180°C [7–10].

Дифференциальные спектры иодопсина и родопсина. На основании данных прямых спектров поглощения дигитониновых экстрактов, полученных из суспензии наружных сегментов фоторецепторов цыплят, невозможно оценить характер поглощения зрительных пигментов. Однако благодаря их

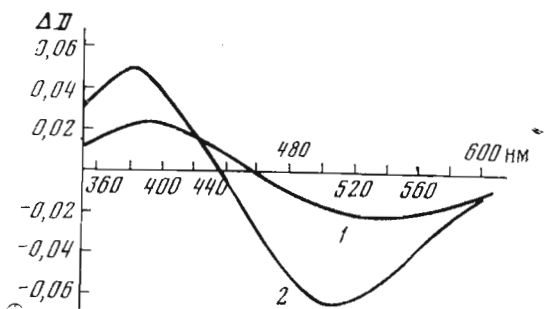


Рис. 1. Дифференциальные спектры, полученные при последовательном облучении дигитонинового экстракта: 1 — красным светом ($\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм), 2 — светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм

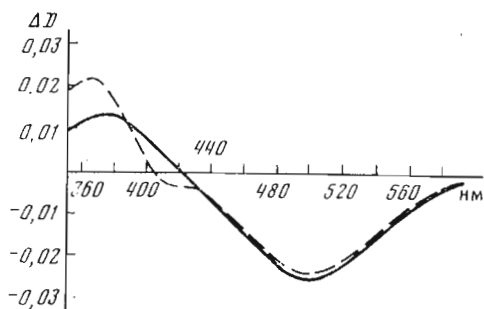


Рис. 2. Дифференциальный спектр поглощения родопсина. Экстракт предварительно обесцвечен светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм в опытной и контрольной кюветках, затем проведено обесцвечивание раствора в опытной кювете светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм. Сплошной линией обозначен спектр, полученный в отсутствие гидроксилламина, пунктиром — в присутствии 0,06 М гидроксилламина

различиям в светочувствительности оказалось возможным подвергнуть анализу дифференциальные спектры родопсина и иодопсина. В частности, при действии красного света наблюдается исчезновение (обесцвечивание) иодопсина, при этом родопсин в экстракте сохраняется. На рис. 1 представлены дифференциальные спектры, полученные после последовательного облучения дигитонинового экстракта красным светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм (спектр 1) и светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм, обесцвечивающим также и родопсин (спектр 2).

Дифференциальный спектр иодопсина (1) характеризуется максимумом при 390 нм и минимумом в области 540 нм.

Такой спектр описан ранее [3] для экстракта, полученного в отсутствие хлоридов. Если при промывании суспензии и приготовлении экстракта вместо буфера мы использовали деионизованную воду, происходило смещение максимума поглощения в коротковолновую область до 525 нм (на рис. 1 этот спектр не представлен). Дифференциальный спектр 2 (рис. 1), полученный при облучении экстракта светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм, является, естественно, суммарным спектром иодопсина и родопсина. Непосредственно дифференциальный спектр родопсина был получен при обесцвечивании раствора в опытной кювете светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм в условиях, когда иодопсин был предварительно обесцвечен как в опытной, так и в контрольной кюветках. Полученный таким образом дифференциальный спектр поглощения родопсина представлен на рис. 2. В этом спектре максимум расположен при 385 нм, минимум — при 506 нм.

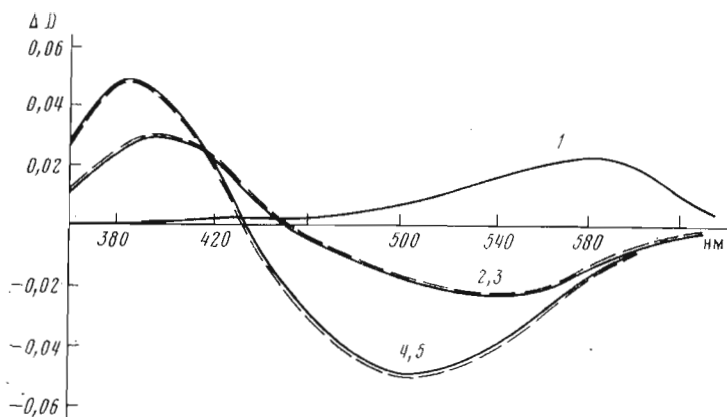


Рис. 3. Влияние NaCl (насыщающая концентрация) на дифференциальные спектры родопсина и иодопсина: темновой экстракт в присутствии NaCl (1), иодопсин (обесцвечивание светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм) в присутствии (2) и в отсутствие (3, пунктир) NaCl, родопсин (обесцвечивание светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм) в присутствии (4) и в отсутствие (5, пунктир) NaCl

При последовательном облучении стандартного дигитонинового экстракта светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм и светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм обесцвечивание иодопсина заканчивается в пределах 60, а родопсина — 10 мин.

Влияние NaCl на дифференциальные спектры поглощения родопсина и иодопсина. Мы сравнивали дифференциальные спектры пигментов в дигитониновом экстракте, снятые в присутствии и в отсутствие NaCl. При этом были использованы три кюветы с аликвотами дигитонинового экстракта, не содержащего NaCl.

Эксперимент проводили следующим образом: против одной и той же контрольной кюветы (образец 1) попеременно снимали дифференциальные спектры поглощения иодопсина в присутствии NaCl в разных концентрациях (образец 2) и без NaCl (образец 3). При этом к первому и третьему образцу добавляли воду, чтобы компенсировать разбавление экстрактов.

При добавлении NaCl ко второму образцу в темноте наблюдалось появление максимума в области 590 нм (рис. 3, спектр 1). Величина этого максимума зависит от концентрации NaCl; полунасыщающая концентрация NaCl равна 0,013% (рис. 4).

При обесцвечивании красным светом образца 2, содержащего насыщающую концентрацию (0,03%) NaCl, получен спектр 2 (рис. 3). Дальнейшее обесцвечивание этого экстракта светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм дает спектр 4.

Аналогичное обесцвечивание образца 3 приводит соответственно к спектрам 3 и 5.

Совпадение спектров 2 и 3 означает, что конечные продукты фотолиза иодопсина в присутствии и в отсутствие NaCl спектрально неразличимы, а совпадение спектров 4 и 5 означает, что количество родопсина в экстракте не меняется при добавлении NaCl.

Следует отметить, что базовой линией для спектров иодопсина является кривая с максимумом при 590 нм, полученная при записи спектра поглощения экстракта в присутствии NaCl. Предварительное облучение красным светом при этом не проводилось. Базовой линией для спектров иодопсина в случае отсутствия NaCl служит соответственно исходная базовая линия.

Спектры 4 и 5 представляют в действительности дифференциальные спектры смеси двух пигментов. Чтобы получить истинный дифференциальный спектр родопсина, нечувствительного к красному свету, нужно вычесть из спектров 4 и 5 спектры 2 и 3 соответственно. Как видно из

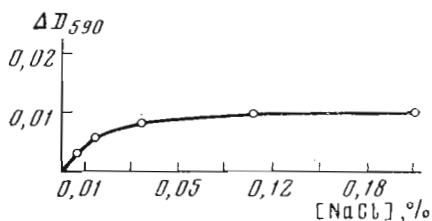


Рис. 4. Зависимость величины максимума поглощения дифференциального спектра, полученного в темноте в присутствии NaCl , от концентрации NaCl

рис. 3, разность спектров 4 и 2 будет равна разности между спектрами 5 и 3, а это означает, что спектр родопсина не меняется при добавлении NaCl и количество родопсина остается неизменным.

Истинный дифференциальный спектр иодопсина в присутствии NaCl можно получить, если добавить NaCl одновременно в обе кюветы, а затем обесцветить только опытную. Полученные таким образом спектры для разных концентраций NaCl представлены на рис. 5. Можно видеть, что они не пересекаются друг с другом во всей спектральной области от 340 до 660 нм.

Дополнительное подтверждение того, что NaCl не влияет на дифференциальный спектр поглощения родопсина, не изменяет его максимум и экстинкцию, дает следующий эксперимент. После обесцвечивания иодопсина красным светом в экстракте остается родопсин. Если верно предположение [3], что иодопсин не является самостоятельным пигментом, то добавление NaCl к такому экстракту должно вызвать частичный переход родопсина в иодопсин. В этом случае при дополнительном (после добавления NaCl в обе кюветы) облучении должен регистрироваться дифференциальный спектр иодопсина.

С целью проверки этого момента дигитониновый экстракт предварительно облучали красным светом для того, чтобы в системе остался только родопсин. Затем добавляли NaCl в концентрации 100 мМ и инкубировали 30 мин. После облучения одной из кювет красным светом не наблюдается возникновения дифференциального спектра иодопсина. Обесцвечивание белым светом выявляло те же количества родопсина, что и в контроле. Таким образом, добавление NaCl к родопсину не приводит к образованию иодопсина.

Специфичность действия анионов хлора. Исследование влияния KCl и NaCl показало, что эти соли действуют одинаковым образом: добавление KCl или NaCl в темновой экстракт вызывает одно и то же увеличение поглощения с максимумом в области 590 нм, а обесцвечивание красным светом идет с одинаковой скоростью и до одного и того же уровня. KI не оказывает влияния в тех же и даже больших концентрациях*. Таким образом, специфическим действием обладает только анион хлора. Подобным образом ведет себя зрительный пигмент геккона [12]. Его спектр поглощения отличается от спектра иодопсина. Тем не менее выявлены аналогичные изменения при действии анионов хлора. Действие аниона хлора специфично и проявляется в том же интервале концентраций NaCl , что и в случае иодопсина цыпленка. Можно предположить, что, несмотря на отчетливые различия, зрительный пигмент геккона и иодопсин имеют подобные анионсвязывающие центры.

Влияние гидроксилamina на спектры поглощения зрительных пигментов. Высвобождающийся в результате фотолиза зрительных пигментов ретиналь способен образовывать неспецифические комплексы с аминокруппами белка и липидов, спектр поглощения которых неопределен. Поэто-

* Независимо от нас действие солей на дигитониновый экстракт из сетчатки цыпленка изучалось Фэгером и сотр. Их экспериментальные данные не опубликованы. Однако выводы, содержащиеся в кратком резюме [11], согласуются с результатами нашей работы.

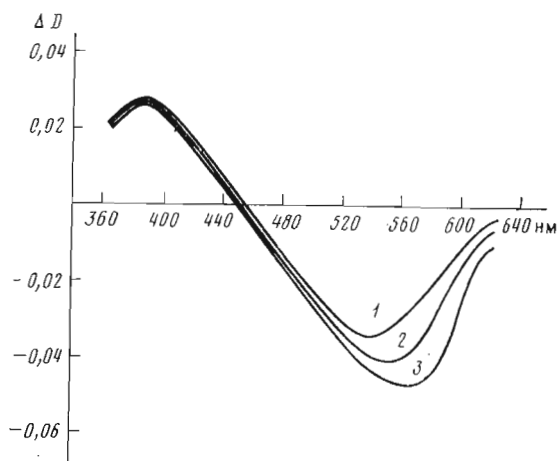


Рис. 5. Дифференциальный спектр поглощения иодопсина (полное обесцвечивание светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм) в отсутствие (1) и в присутствии 2 мМ (2) и 30 мМ (3) NaCl

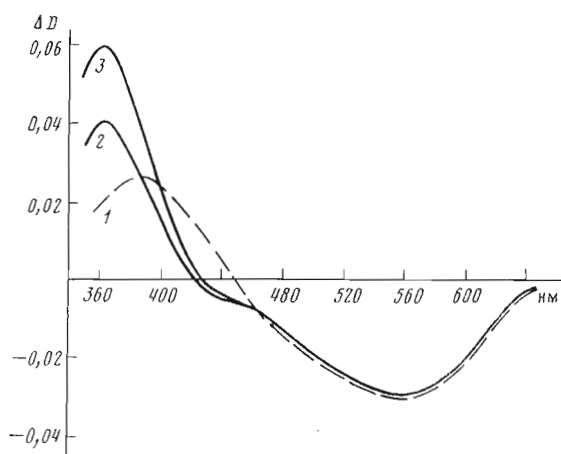


Рис. 6. Дифференциальный спектр поглощения иодопсина: 1 — обесцвечивание экстракта красным светом, 2 — обесцвечивание экстракта 0,06 М гидроксиламином в темноте (20 мин инкубации); 3 — 0,06 М гидроксиламин добавлен после полного обесцвечивания экстракта красным светом

му обычно используют гидроксилламин, при взаимодействии которого как со свободным, так и со связанным в Шиффовом основании ретиналем образуется оксим [13]. Мы использовали это для получения стандартных дифференциальных спектров иодопсина и родопсина.

Нами исследовано влияние гидроксилламина на темновой экстракт. При этом наблюдалось обесцвечивание иодопсина, заканчивающееся примерно через 20 мин, и появление в спектре экстремумов при 560 и 365 нм. Обесцвечивания родопсина, который, как известно [14], устойчив к действию гидроксилламина, при этом не происходило.

Добавление гидроксилламина к экстракту, предварительно обесцвеченному красным светом, приводит к дифференциальному спектру 3 (рис. 6).

Дальнейшее облучение экстракта светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм (в присутствии гидроксилламина) выявляет дифференциальный спектр родопсина, показанный на рис. 2.

Изменения с максимумом при 420 нм, возникающие в дифференциальных спектрах поглощения родопсина и иодопсина в присутствии гидроксиламина, вызваны скорее всего его действием на примеси компонентов крови, содержащиеся в экстракте.

Можно видеть, что максимум поглощения оксима ретиналя, получаемого при обесцвечивании иодопсина и родопсина, приходится на одну и ту же длину волны (365 нм). Отношения же интенсивностей в точках экстремумов различны: для иодопсина $\Delta D_{365}/\Delta D_{560}$ равно 2,1 (рис. 6, спектр 3), а для родопсина $\Delta D_{365}/\Delta D_{560} = 0,87$.

Различие этих величин может быть обусловлено разной молярной экстинкцией иодопсина и родопсина.

Таким образом, добавление хлоридов к дигитониновому экстракту наружных сегментов фоторецепторов цыпленка приводит к батохромному сдвигу в спектре поглощения иодопсина и не влияет на спектр поглощения родопсина. Это позволяет предположить, что иодопсин является ионохромным пигментом, анионосвязывающий и хромофорный центр которого взаимосвязаны.

Экспериментальная часть

Выделение суспензии наружных сегментов фоторецепторов цыплят проводили на центрифугах К-23 (до 6000g) и Beckman J-21 В.

Квалификация использованных реагентов: сахараза — х.ч., KI, KCl — ч.д.а., NaCl — о.ч., Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 — о.ч., $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ — ч.д.а., дигитонин — фирмы Merck.

Спектры сняты с помощью спектрофотометра Shimadzu MPS-5000. Для обесцвечивания экстракта использована приставка — монохроматор к Shimadzu.

Поглощение дигитониновых экстрактов после обесцвечивания светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 610 нм (в максимуме поглощения) составляло 0,02—0,03 ед. оптической плотности, а после обесцвечивания светом с $\lambda_{\text{макс}}$ 570 нм — соответственно 0,03—0,04 ед. Каждая кювета содержала по 3,5 мл экстракта.

Зрительные пигменты выделены из глаз трехмесячных цыплят, полученных с Московского птицекомбината. Головы цыплят привозили в лабораторию в затемненной сумке, охлажденной льдом. Всю работу по выделению пигментов проводили при температуре 5° С.

После эмульсации глаза разрезали бритвой экваториально, снимали сетчатки пинцетом и складывали в пробирку. Если сетчатки использовали на следующий день, то их хранили замороженными при -6° С.

70 сетчаток взмучивали в 70 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 6,5 (этот буфер использовали и в дальнейшем). Промытые таким образом сетчатки осаждали центрифугированием при 3000g в течение 10 мин, затем растирали в фарфоровой ступке в течение 10 мин, добавив к ним 5 мл 35% раствора сахарозы, приготовленного на фосфатном буфере. Растиертую массу пропускали через ситечко с отверстиями размером 1 мм. Фильтрат довели до объема 30 мл тем же раствором сахарозы, а затем центрифугировали 30 мин при 3500g. Супернатант разбавляли буфером до плотности 1,05 г/мл и центрифугировали 30 мин при 6000g. Осадок, содержащий наружные сегменты фоторецепторов, отмывали от сахарозы и водорастворимых примесей суспендированием в фосфатном буфере и пересаживанием с помощью центрифугирования при 20 000 g в течение 15 мин. Затем осадок суспендировали в 11 мл 1,5% раствора дигитонина в фосфатном буфере при 20° С в течение 1 ч. Суспензию центрифугировали 30 мин при 40 000 g и полученный экстракт использовали в дальнейшей работе.

Для экстрактов из суспензии наружных сегментов фоторецепторов быка или лягушки, содержащих только родопсин, спектральный критерий чистоты P_{500} (равен отношению D_{280}/D_{500}) составляет обычно 2,0—2,5. Экстракт из сетчатки цыпленка представляет собой сложную смесь с не-

светочувствительными примесями, поглощение которых значительно выше, чем у родопсина и иодопсина. За счет этого спектральный критерий P_{560} в данном случае равен примерно 10. Спектральный вклад этих примесей удается тем не менее исключить, получая дифференциальные спектры поглощения, характеризующие конкретный пигмент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wald G. (1937) *Nature*, **140**, 545.
2. Hönig B. (1978) *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **29**, 31–57.
3. Knowles A. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **73**, 56–62.
4. Wald G., Brown P. K., Smith P. H. (1955) *J. Gen. Physiol.*, **38**, 623–681.
5. Matsumoto H., Tokunaga F., Yoshizawa T. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **404**, 300–308.
6. Fager R. S., Kandel M., Heppner T., Abrahamson E. W. (1975) *Vision Res.*, **15**, 741–742.
7. Hubbard R., Kropf A. (1959) *Nature*, **183**, 448–450.
8. Yoshizawa T., Wald G. (1967) *Nature*, **214**, 566–571.
9. Tsukamoto Y., Horiuchi S., Yoshizawa T. (1975) *Vision Res.*, **15**, 819–823.
10. Hubbard R., Bownds D., Yoshizawa T. (1965) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **30**, 301–315.
11. Fager L. Y., Fager R. S. (1977) *Biophys. J.*, **17**, 16a, W-AM-C6.
12. Crescitelli F. (1977) *Science*, **195**, 187–188.
13. Dartnall H. J. A. (1962) *The Eye*, vol. 2, p. 323, Acad. Press, N. Y.—London.
14. Johnson R. H. (1970) *Vision Res.*, **10**, 897–900.

Поступила в редакцию
24.VII.1979

A STUDY OF IONOCROMIC PROPERTIES OF CHICKEN VISUAL PIGMENTS

SLOBODYANSKAYA E. M., ABRASHIN E. V., OSTROVSKY M. A.

Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

Chicken rhodopsin and iodopsin were shown to differ in their sensitivity towards chloride anions. For the former there are no changes in the absorption spectrum in the presence of NaCl, whereas for the latter NaCl elicits a bathochrome shift. No conversion of rhodopsin into iodopsin is observed under the action of NaCl.
