



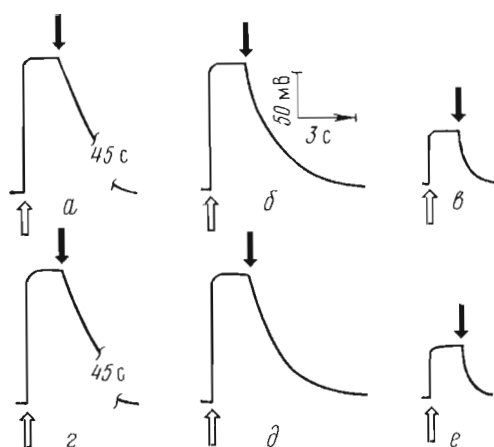
УДК 577.159:578.087.87

**ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ БАКТЕРИОРОДОПСИНА  
В СИСТЕМАХ ЛИПИД — ВОДА****Войццкий В. М., Драчев Л. А., Каулен А. Д.,  
Скулачев В. П.***Лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии  
им. А. Н. Белозерского, МГУ*

Образование светозависимой разности электрических потенциалов на границе раздела липид — вода исследовано в трех модельных системах, содержащих бактериородопсин. В системе декановый раствор азолектина — вода обнаружен фотоэффект, аналогичный описанному ранее для бактериородопсина, включенного в липидную мембрану и коллоидную пленку, пропитанную раствором фосфолипидов в декане. Фотоэффект ингибируется протонофорами и грамицидином А в присутствии  $K^+$  и  $Na^+$ . В двухфазной системе Стокениуса, отличающейся от предыдущей модели прежде всего меньшим количеством фосфолипидов в липидной фазе, показан фотоэффект, подобный описанному выше, но с тем различием, что протонофоры в малых концентрациях увеличивали фотоэффект, а в высоких — уменьшали его. Сходным образом влияли на фотоэффект анионы фенилдикарбаундекаборана. В системе декан — вода фотоэффект может быть зарегистрирован вибрирующим электродом, помещенным над декановой фазой, но не хлорсеребряным, соединенным через агаровый мостик с этой фазой. В последней системе фотоэффекты наблюдались при введении не только бактериородопсина, но и свободного ретиналя.

Цель настоящей работы состояла в изучении природы фотоэлектрических ответов бактериородопсина в модельных системах липид — вода. Впервые исследования такого типа были проведены в группе Богуславского [1], а затем Стокениуса [2, 3]. Как те, так и другие авторы наблюдали появление положительного заряда в фазе декана в ответ на включение света в системе декан — вода с бактериородопсиновыми бляшками, сорбированными на поверхности раздела фаз. Эффект требовал присутствия разобшителя-протонофора, избыток которого уменьшал фотоответ (в опытах Стокениуса и соотр. [2, 3]) и не влиял на него (в опытах Богуславского и др. [1]). Авторы сделали заключение, что роль разобшителя состоит в акцептировании протонов, транспортируемых бактериородопсином из воды в декан (октан). Создавалось впечатление, что исследуемая модель адекватна «полумембране», где есть только две фазы, липидная и водная, и только одна поверхность раздела, в то время как в «полной мембране» ситуация осложняется наличием второй водной фазы и двух поверхностей раздела. Приняв эту точку зрения, можно было бы полагать, что система декан (октан) — вода является простейшей моделью, где может изучаться функция бактериородопсина как протонной лампы. Данные настоящей работы не позволяют разделить оптимизм цитируемых выше авторов. Как показали наши опыты, существует несколько типов фотоэлектрических ответов бактериородопсина в системе липид — вода, но ни один из них не может объясниться переносом  $H^+$  из воды в липид.

Рис. 1. Действие протонофорного разбщителя ХКФ на амплитуду и характер фотоответов бактериородопсина в системе декановый раствор азолектина — вода. Инкубационная смесь — см. «Экспер. часть». Измерения проводили с помощью вибрирующего (а-с) или погруженного (г-е) электрода. а, г — без ХКФ; б, д —  $10^{-6}$  М ХКФ; в, е —  $10^{-5}$  М ХКФ. Здесь и далее светлые стрелки означают включение света, темные — его выключение



*Система декановый раствор азолектина — вода.* В первой серии опытов бактериородопсин добавляли к системе, в которой липидная фаза представляла собой декановый раствор азолектина (2 мг азолектина в 1 мл декана). Как показали опыты, небольшой по амплитуде фотоответ (несколько милливольт) возникал сразу после добавления бактериородопсиновых бляшек в водную фазу. Затем амплитуда фотоответов постепенно увеличивалась, причем скорость увеличения возрастала при добавлении в водную фазу  $\text{CaCl}_2$ . По аналогии с данными для плоских фосфолипидных мембран [4, 5] можно думать, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  облегчают прикрепление бактериородопсиновых бляшек к монослою фосфолипидов на границе раздела фаз. Достижение максимальной амплитуды фотоответов при комнатной температуре происходило через 4—5 ч. Максимальная амплитуда фотоответов достигала 200 мВ.

На рис. 1 а, г приведены фотоответы, зарегистрированные вибрирующим и погруженным (вводимым в слой деканового раствора азолектина через агаровый мостик) электродами. В обоих случаях амплитуды фотоответов оказывались практически одинаковыми.

При освещении вибрирующей и погруженный электроды всегда регистрировали потенциал положительного знака. Сходным образом при встраивании бактериородопсиновых бляшек из раствора в плоскую фосфолипидную мембрану при освещении положительно заряжался отсек кюветы, не содержащий бактериородопсина [4—11].

Спектр действия фотоответов, регистрируемых вибрирующим и погруженным электродами, имел широкий максимум в области 560—570 нм, совпадающий по форме со спектром поглощения бактериородопсина (краткое сообщение о некоторых результатах этой работы было опубликовано ранее [12]).

Низкие концентрации протонофорного разбщителя *m*-хлоркарбонилцианидфенилгидразона (ХКФ) не влияли на амплитуду фотоответов, а высокие приводили к ее уменьшению и ускорению во времени возвращения разности потенциалов до исходного уровня при выключении постоянного света, причем оба электрода регистрировали одинаковые изменения (рис. 1 б, в, д, е). Такие же эффекты были описаны ранее и в опытах с бактериородопсином, встроенным в плоские липидные мембраны [4, 5].

На рис. 2 показан эффект синтетического проникающего аниона фенилдикарбаундекаборана (ФКБ<sup>-</sup>). Видно, что в системе декановый раствор азолектина — вода наблюдается увеличение амплитуды фотоответов низкими концентрациями ФКБ<sup>-</sup> и уменьшение — высокими (рис. 2, 1). Это же явление наблюдается и на встроенных в коллоидную пленку бактериородопсиновых бляшках (рис. 2, 2). Эффект ФКБ<sup>-</sup> разви-

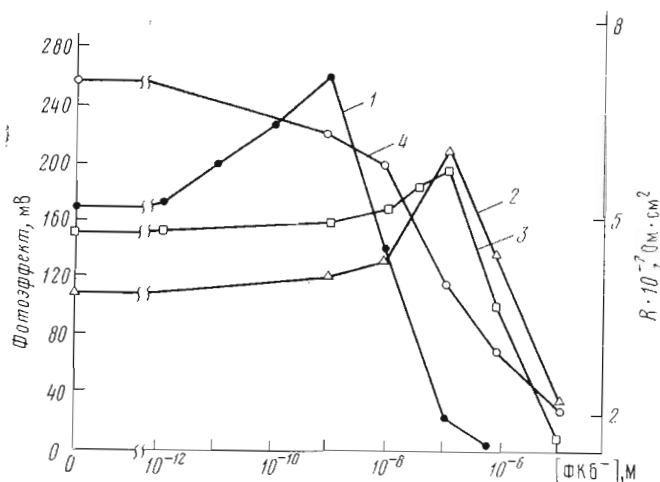


Рис. 2. Действие  $\text{FKB}^-$  на амплитуду фотоответов бактериородопсина. 1 и 3 — система декановый раствор азолектина — вода. Условия — см. «Экспер. часть». Состав липидной фазы: 1 и 3 — 2 и 60 мг азолектина/мл декана. 2 и 4 — бактериородопсин встроены в коллоидную пленку, пропитанную фосфолипидом (60 мг/мл). После окончания встраивания инкубационная среда в обоих отсеках заменена на 50 мМ трис-HCl, pH 7,4. 4 — зависимость сопротивления коллоидной пленки, пропитанной фосфолипидом, от концентрации  $\text{FKB}^-$ . Зависимости, изображенные кривыми 2 и 4, получены в одной и той же пробе

вался на фоне монотонного снижения сопротивления коллоидной пленки (рис. 2, 4). Различие в действующих концентрациях  $\text{FKB}^-$  в этих двух системах связано, по-видимому, с различной концентрацией фосфолипидов. Так, если концентрация азолектина в системе декановый раствор азолектина — вода была повышена с 2 до 60 мг в 1 мл декана (как и в опытах с коллоидной пленкой), то действующие концентрации  $\text{FKB}^-$  в этих двух системах оказываются одного порядка (рис. 2, 3).

Сходство результатов, полученных в системе декановый раствор азолектина — вода и в системе плоской фосфолипидной мембраны или коллоидной пленки, пропитанной фосфолипидом, можно объяснить, допустив, что во всех этих случаях фотоответ описывается одной и той же схемой [4, 5, 11]. Согласно этой схеме, фотоэлектрические ответы обусловлены светозависимым переносом ионов  $\text{H}^+$  в обводненную щель между одной из поверхностей плоской мембраны и прикрепившейся к ней бактериородопсиновой бляшки. Источником ионов  $\text{H}^+$ , переносимых в эту обводненную щель, служит водное пространство, омывающее ту поверхность плоской мембраны, которая покрыта бактериородопсиновыми бляшками.

Как показали дальнейшие опыты, кинетика и амплитуда фотоответов, а также сопротивление липидной фазы не зависят от глубины погружения агарового мостика хлорсеребряного электрода в липидную фазу. Полученные данные становятся понятными, если принять, что эквивалентная схема толстой плоской мембраны (или слоя деканового раствора фосфолипидов) представляет собою цепь из трех последовательно соединенных сопротивлений. Два из них обусловлены границами раздела липид — вода на поверхности липидной фазы, обращенной в воду, и в зоне контакта водной фазы мостика электрода с липидной фазой. Третье сопротивление связано с объемом липидной фазы и существенно меньше двух других\*. Из этого следует, что поверхность, прилегающая к границе раздела липид — вода со стороны липидной фазы, оказывается практически

\* Аналогичный подход к рассмотрению эквивалентной схемы толстой мембраны можно найти в работе [13].

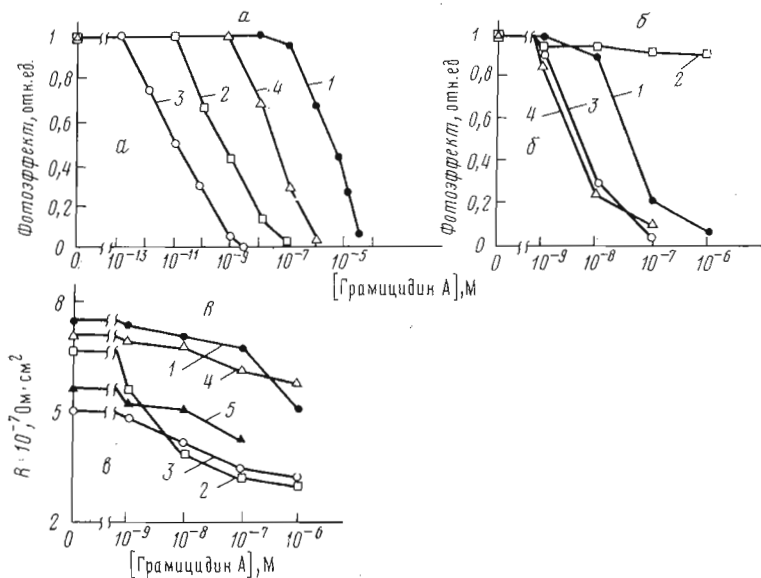


Рис. 3. Действие грамицидина А на амплитуду фотоответов бактериородопсина. *а* — в системе декановый раствор азолектина — вода. Инкубационная смесь: 1 — «Эксер. часть»; 2 — +1 мМ КСl; 3 — +100 мМ КСl; 4 — кроме СаСl<sub>2</sub> и бляшек MES 50 мМ, рН 6,0. *б*, *в* — действие грамицидина А на амплитуду фотоответов и сопротивление коллоидной пленки, пропитанной раствором фосфолипидов. После окончания встраивания бактериородопсина инкубационная среда в обоих отсеках кюветы заменена на: 1 — 50 мМ трис-НСl, рН 7,4; 2, 3, 5 — 100 мМ NaСl; 2,5 мМ ЕDТА, рН 6,0; 4 — 100 мМ КСl; 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Добавки грамицидина А производились: 1, 3, 4 — в отсек, где был бактериородопсин; 2 — в отсек, где не было бактериородопсина. Кривая 5 — коллоидная пленка, пропитанная фосфолипидом, без встроенных бактериородопсиновых бляшек. Амплитуда фотоответов измерялась на линейном участке зависимости от интенсивности света

эквивалентальной (при условии, что сопротивление измерительной схемы значительно больше всех сопротивлений системы). Таким образом, как вибрирующий, так и погруженный электроды измеряют одну и ту же разность электрических потенциалов, возникающую на границе раздела двух основных фаз: липидной и водной.

В рамках предложенной выше схемы механизм действия проникающего аниона ФКБ<sup>-</sup>, по-видимому, заключается в том, что он, накапливаясь в липидной фазе, диффундирует в обводненную щель под действием возникающей на свету разности электрических потенциалов. При этом низкие концентрации ФКБ<sup>-</sup> снижают переходное сопротивление на границе раздела между основной липидной фазой и обводненной щелью. Высокие концентрации ФКБ<sup>-</sup> снижают, по-видимому, сопротивление мембраны бляшки и деканового слоя с фосфолипидами.

Предложенная эквивалентная схема получила подтверждение в опытах с грамицидином А, который может шунтировать только достаточно тонкие липидные мембраны, образуя каналы, проницаемые для одновалентных катионов [14]. Грамицидин А уменьшает амплитуду фотоответов в системе декановый раствор азолектина — вода. Эффект грамицидина А зависит от концентрации ионов К<sup>+</sup> и Na<sup>+</sup>, а также ионов Н<sup>+</sup>, которые тоже проходят через грамицидиновый канал. Как видно из рис. 3 *а*, добавление ионов К<sup>+</sup> или просто подкисление среды резко снижают количество грамицидина А, необходимое для ингибирования фотоответа.

Аналогичные данные были получены в опытах с коллоидной пленкой. Грамицидин А вызывал снижение амплитуды фотоответов только в том случае, если его добавляли в отсек кюветы, содержащий бактериородопсиновые бляшки (рис. 3б, ср. кривые 1 и 2). Добавление в среду

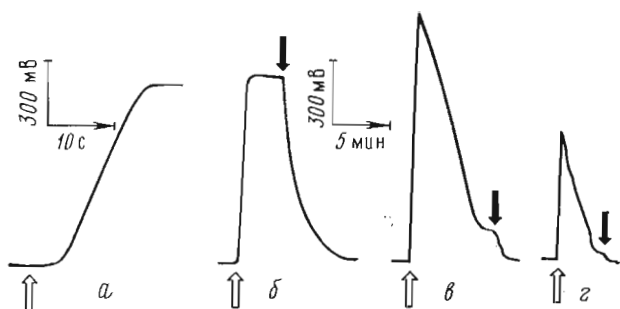


Рис. 4. Характер фотоответов в системе декан – вода в зависимости от спектрального состава света. Водная фаза: 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мкг/мл бактериородопсина. Измерения проводились с помощью вибрирующего электрода. Луч света пропускался через светофильтры: а, б – СЗС-25; в – без фильтров; г – ИКС-7

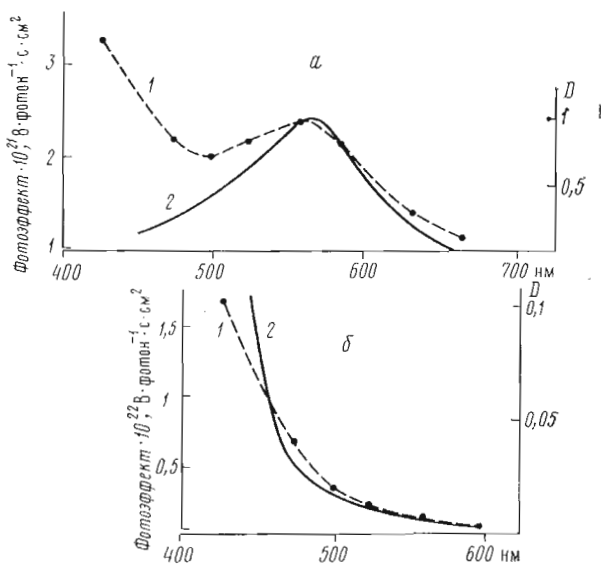


Рис. 5. Спектры действия (1а, 1б) в системе декан – вода и спектры поглощения (2а, 2б) бактериородопсина и *полностью-транс*-ретиналя. Водная фаза: а – 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мкг/мл бактериородопсина; б – 50 мМ трис-НСI (рН 7,4),  $10^{-4}$  М ретиналь

инкубации ионов  $K^+$  или  $Na^+$  также стимулировали шунтирующий эффект грамицидина А (рис. 3б, 3 и 4).

Во всех этих опытах помимо амплитуды фотоответов измерялось сопротивление коллоидной пленки. Исходное сопротивление коллоидных пленок со встроенными в них бактериородопсиновыми бляшками или без бляшек колебалось от  $5 \cdot 10^7$  до  $7,5 \cdot 10^7$  Ом·см<sup>2</sup>. Грамицидин А вызывал сравнительно небольшое снижение сопротивления, которое практически не зависело от концентрации  $K^+$ ,  $Na^+$  и  $H^+$  (рис. 3в). Таким образом, можно заключить, что снижение фотоэффекта в системе с коллоидной пленкой грамицидином А связано с шунтированием мембраны бактериородопсиновых бляшек, прикрепленных к пленке, а не с шунтированием самой пленки.

Различные в действующих концентрациях грамицидина А в системе декановый раствор азолектина – вода (рис. 3а) и в системе с коллоиде-

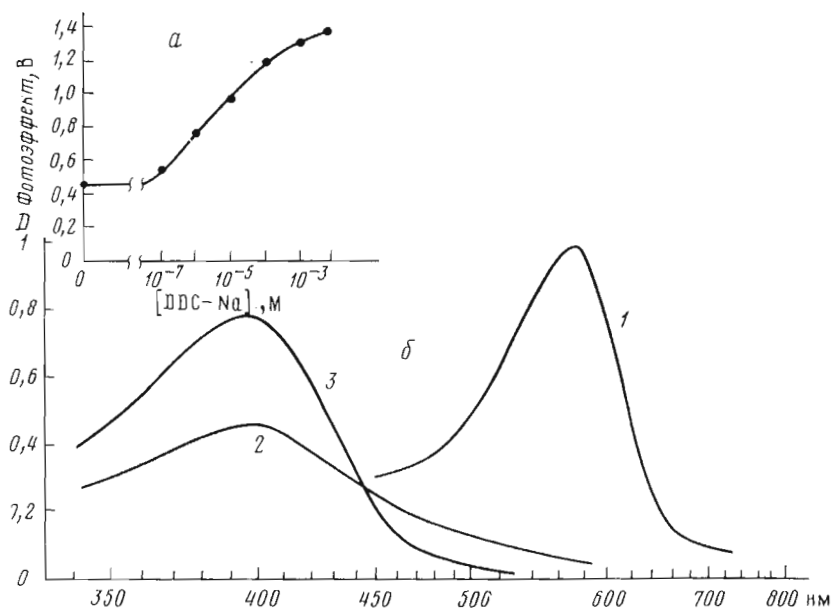


Рис. 6. Действие ДДС-На на амплитуду фотоответов в системе декан — вода. Водная фаза: 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 50 мкг/мл бактериородопсина; а — фотоответы бактериородопсина при разных концентрациях ДДС-На. б — спектры поглощения: 1 — бактериородопсина; 2 — бактериородопсина, обработанного ДДС-На 10<sup>-2</sup> М; 3 — *полностью-транс*-ретицала в присутствии 10<sup>-2</sup> М ДДС-На

вой пленкой (рис. 3б) связано, как и в опытах с ФКБ<sup>-</sup>, с различной концентрацией фосфолипидов.

*Система декан — вода.* В случае, когда в декановой фазе отсутствует фосфолипид, а в водную фазу добавлены бактериородопсиновые бляшки, наблюдается также фотозависимое образование потенциала, регистрируемое вибрирующим электродом (рис. 4) (погруженным электродом в этом случае не удастся проводить измерения, так как сопротивление деканового слоя значительно больше входного сопротивления операционного усилителя).

В подобной системе фотоответы наблюдались при добавлении в водную фазу свежевыделенных препаратов фиолетовых бляшек. Если же использовались препараты бляшек, хранившиеся несколько дней, то их необходимо было подвергнуть обработке, указанной ниже в «Экспериментальной части».

Характер фотоответов, наблюдаемых в системе декан — вода, отличается от фотоответов, описанных в предыдущем разделе. Фотозависимое изменение потенциала наблюдается только через несколько секунд после включения постоянного света максимальной интенсивности (рис. 4а). При выключении света также наблюдается лаг-фаза перед началом возвращения фотопотенциала к исходному уровню. Максимальная амплитуда фотоответов достигала 1,85 В.

В опытах, описанных выше, фотоэффект возбуждался лучом постоянного источника света, пропущенным через тепловой фильтр (1-см слой воды) и фильтр СЗС-25 (область пропускания от 300 до 820 нм). При освещении же кюветы белым светом (без фильтра СЗС-25) наблюдались фотоответы иного характера: при достижении максимальной амплитуды после включения света имело место резкое самопроизвольное уменьшение потенциала к исходному уровню, хотя свет не выключался (рис. 4 в). Такой же характер носили фотоответы, получаемые в случае, когда луч света проходил через светофильтр ИКС-7 (область пропускания 820—3000 нм) (рис. 4г).

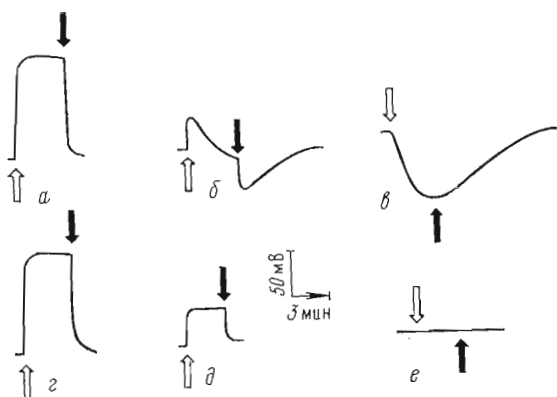


Рис. 7. Появление медленного фототовета при действии грамицидина А в системе декановый раствор азолектина — вода. Условия — см. «Экспер. часть». В водную фазу добавлено 100 мМ КСІ. *a-e* — измерения вибрирующим электродом; *г-е* — измерения погруженным электродом. Добавки: *б, д* —  $10^{-10}$  М грамицидин А; *в, е* —  $10^{-8}$  М грамицидин А.

При повышении температуры инкубационной среды в термостатируемой ячейке сохранялся тот же тип фототоветов при освещении светом различного спектрального состава (белый свет или свет, пропущенный через светофильтры СЗС-25 и ИКС-7), однако наблюдалось уменьшение амплитуды фототоветов.

Направление фототоветов, вызываемых бактериородопсином в системе декан — вода, варьировало от пробы к пробе. При этом было замечено, что знак фототоветов зависит от знака и величины потенциала, возникающего при добавлении бактериородопсиновых бляшек в водную фазу в темноте.

Наложение электрического поля на границу раздела декан — вода приводило к уменьшению или увеличению фототоветов в зависимости от знака электрического поля и знака фототоветов. Так, наложение поля, направленного таким образом, что фаза декана заряжалась положительно, приводило к уменьшению амплитуды фототоветов того же направления и к увеличению амплитуды фототоветов противоположного направления.

Спектр действия фототоветов бактериородопсина в системе декан — вода приведен на рис. 5а. Как видно из графика, кривая спектра действия наряду с характерным для бактериородопсина широким максимумом в области 560 нм имеет резкий подъем в коротковолновой области спектра.

Аналогичные по характеру фототоветы наблюдались в системе декан — вода после добавления в водную фазу ретиналя вместо бактериородопсина. Максимальная амплитуда фототоветов в этом случае достигала 600 мВ. Фототоветы, вызванные наличием в водной фазе ретиналя, уже наблюдаются при концентрации ретиналя  $10^{-9}$  М. Следует отметить, что обычно при изучении фототоветов бактериородопсина использовали на три порядка большие концентрации бактериородопсина ( $2 \cdot 10^{-6}$  М). Спектр действия фототоветов в опытах с ретиналем в водной фазе совпадает со спектром поглощения ретиналя (рис. 5б).

Сравнение спектров действия проб с бактериородопсином и ретиналем позволяет предположить, что наряду с самим бактериородопсином вклад в фотототет бактериородопсиновых бляшек в системе декан — вода вносит ретиналь (либо связанный с молекулой белка, либо свободный, т. е. отщепившийся от бактериородопсина). Подтверждением этого является тот факт, что: 1) при длительном озвучивании препарата бактериородопсиновых бляшек, приводящем к полному исчезновению пика поглощения при 570 нм, наблюдаются большие по амплитуде фототоветы, имеющие спектр действия, подобный ретиналю; 2) при добавлении в среду инкубации додецилсульфата натрия (ДДС-Na) амплитуда фототоветов увеличивается (рис. 6а). При этом происходит денатурация бактериородопсина, приводящая к исчезновению его основной полосы поглощения (рис. 6б, 1) и появлению пика поглощения свободного ретиналя (рис. 6б, 2). На рис. 6б, 3 для сравнения приведен спектр поглощения

водного раствора *полностью-транс*-ретинала в присутствии такой же концентрации ДДС-На.

При добавлении грамицидина А можно получить фотоответы описанного выше типа и в системе декановый раствор азолектина — вода. Оказалось, что в условиях, когда исходный фотоэффект в этой системе полностью подавлен грамицидином А, развивается значительно более медленный фотоэффект обратного знака. Этот фотоэффект может быть зарегистрирован только вибрирующим электродом, но не погруженным (рис. 7). Хотя фотоответ, показанный на рис. 7в, характеризуется более медленной кинетикой и меньшей амплитудой, чем в системе декан — вода, все же есть основания полагать, что оба эти феномена имеют одну и ту же природу. Во-первых, в обоих случаях наблюдается характерное запаздывание начала нарастания фотопотенциала после включения света. Во-вторых, наибольший вклад в амплитуду фотоответов вносит коротковолновая часть спектра.

Подобный медленный фотоответ можно наблюдать в системе декановый раствор азолектина — вода не только при действии грамицидина А, но и просто при низких значениях рН. Так, при рН 4 характер фотоответов такой же, как и в случае действия больших концентраций грамицидина А. Это обстоятельство позволило предположить, что при нейтральном рН роль грамицидина А состоит в закислении водного пространства в щели между бактериородопсиновой бляшкой и липидной фазой. Закисление должно быть следствием работы бактериородопсина как протонного насоса и электрофоретического транспорта  $K^+$ , концентрация которого в этом опыте была 0,1 М. В результате разность электрических потенциалов, образуемая бактериородопсином, должна была превратиться в разность рН между водой в щели и водной фазой инкубационной смеси. Вследствие малого объема щели это будет означать смещение рН в щели при практически неизменном рН инкубационной смеси.

По-видимому, медленный фотоэффект обусловлен какими-то изменениями на границе раздела липид — вода, будучи вторичным следствием работы бактериородопсинового насоса. Как мы видели выше, его роль может ограничиваться закислением водной щели. Закисление в свою очередь могло бы вызвать, например, отщепление ретинала от белка с последующей его сорбцией на поверхность раздела липид — вода. В этом случае какое-либо фотопревращение сорбированного ретинала могло бы отвечать непосредственно за светозависимое изменение потенциала на межфазной границе. Как и в случае скачка вольта-потенциала на границе фаз, подобный фотоэффект может быть измерен вибрирующим, а не погруженным электродом.

Известно, что поглощение кванта света ретиналом вызывает увеличение дипольного момента этой молекулы [15]. Однако вряд ли этот эффект может объяснить медленный фотоответ, поскольку скорость последнего слишком мала и возникает он спустя некоторое время после включения света. По той же причине маловероятна простая переориентация молекул ретинала на поверхности раздела под влиянием освещения. Более вероятно, что фотоответ связан с фотохимическим превращением ретинала (по-видимому, фотоокислением). Подобное предположение подтверждается тем, что продувание модельной системы аргоном приводит к полному исчезновению фотоэффекта. При последующем же продувании кислородом фотоэффект появляется вновь.

Как видно из опытов, приведенных в этой части работы, фотоэффект в системе декан — вода не требует добавления разобщителей-протонофоров, в то время как в сообщении Богуславского и др. [1] отмечалась необходимость компонентов такого рода. Причина указанного различия результатов осталась невыясненной.

*«Двухфазная» система Стокениуса.* В заключительной серии опытов мы предприняли попытку воспроизвести результаты цитированных выше ра-



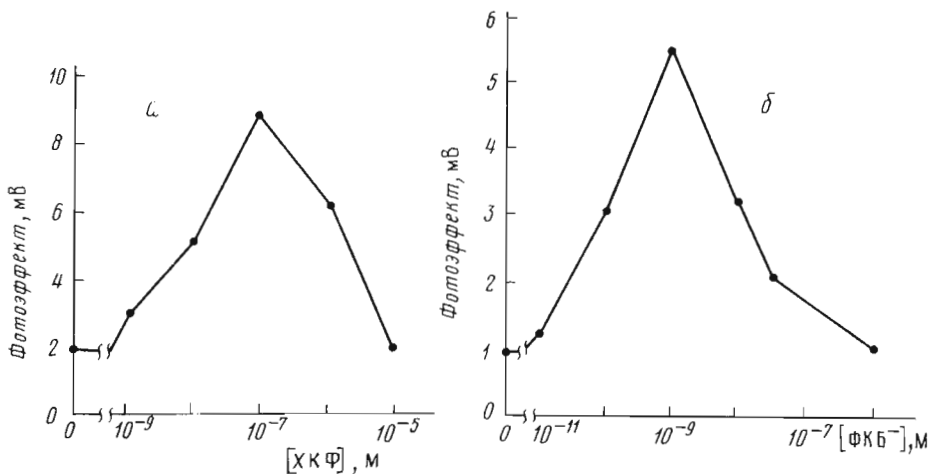


Рис. 8. Действие ХКФ (а) и ФКБ<sup>-</sup> (б) на амплитуду фототетов в системе Стокениуса. Измерения проводились с помощью вибрирующего электрода. Условия — см. текст

бот Стокениуса и сотр. [2, 3] и исследовать механизм описанного ими фотоэффекта. Использовалась предложенная этими авторами методика приготвления монослоя препаратов бактериородопсиновых бляшек на поверхности раздела двух несмешивающихся фаз. Смесь водного раствора бляшек с гексановым раствором фосфатидилхолина перемешивали, озвучивали и центрифугировали. Неокрашенную водную фазу отбрасывали, а оставшиеся фазы после добавления новой порции гексана озвучивали. Затем гексановый слой наносили на поверхность воды. После испарения гексана на образовавшийся монослой наслаивали декан. Освещение такой системы вызывало небольшой фототет (плюс на стороне липидной фазы), амплитуда ответа — 1–3 мВ. Низкие концентрации ( $10^{-9}$ – $10^{-7}$  М) протонфорного разобчителя ХКФ после добавления его в среду инкубации приводили к увеличению амплитуды фототетов, а высокие ( $5 \cdot 10^{-7}$ – $10^{-5}$  М) — к ее уменьшению (рис. 8а).

При добавлении в описанную выше систему вместо ХКФ жирорастворимого аниона ФКБ<sup>-</sup> наблюдалось увеличение амплитуды фототетов в области чрезвычайно малых концентраций этого аниона ( $10^{-11}$ – $10^{-9}$  М). Больше его количество ( $5 \cdot 10^{-9}$ – $10^{-6}$  М) ингибировало фототет (рис. 8б). Характер фототетов в обоих описанных выше случаях был одинаковым. В частности, грамицидин А, добавленный в среду инкубации, когда амплитуда фототетов была максимальной, вызывал уменьшение амплитуды фототетов. Действие грамицидина А стимулировалось добавлением ионов  $K^+$ .

Одинаковый характер действия грамицидина А и ФКБ<sup>-</sup> в системе декановый раствор азолектина — вода и в системе, предложенной Стокениусом, позволяет предполагать, что способы ассоциации бактериородопсиновых бляшек с границей раздела в обеих системах принципиально не различаются.

Поэтому ингибирующий эффект грамицидина А, стимулируемый ионами  $K^+$ , а также действие больших концентраций разобчителей-протонфоров в системе Стокениуса легко объясняются шунтированием мембраны бляшки.

Остается неясной природа стимулирующего действия малых концентраций разобчителей. Существенно, что их эффект воспроизводится очень малым количеством ФКБ<sup>-</sup>, жирорастворимым аналогом сильной кислоты, которая не может служить акцептором протонов и поэтому не обладает протонфорной способностью. Этот факт противоречит предположению Сто-

кешуса и сотр. о том, что использованные ими разобшающие агенты служат акцепторами протонов в липидной фазе.

Одно из объяснений эффекта разобшителей могло бы состоять в том, что анионы разобшителей заполняют поверхность раздела липид — вода и тем самым способствуют связыванию бляшек межфазной границы.

Другое и, по-видимому, более вероятное объяснение сводится к тому, что разобшители подобно ФКБ<sup>-</sup> в системе декановый раствор фосфолипидов — вода уменьшают переходное сопротивление на границе раздела между основной липидной фазой и водной фазой в щели, отделенной от основной водной фазы мембраной бляшки.

Суммируя материал, изложенный выше, мы можем заключить, что фотоэлектрические эффекты в системах липид — вода, содержащих бактериородопсин, имеют более сложный характер, чем перенос иона  $H^+$  из воды в липид (см. [1—3]). Системы такого типа в действительности содержат более двух фаз. В случае, если в углеводороде, образующем основную липидную фазу, присутствуют фосфолипиды, фотоэлектрический эффект можно объяснить переносом ионов  $H^+$  из основной водной фазы в обводненную щель между бактериородопсиновой бляшкой и основной липидной фазой. В случае, когда органическая фаза представляет собой слой углеводорода без фосфолипида, фотоэффект имеет совсем иную природу и обусловлен, по-видимому, фотоокислением ретиналя, который отщепляется от бактериородопсина и сорбируется на поверхность раздела основных фаз.

### Экспериментальная часть

Бактериородопсиновые бляшки из *H. halobium* штамма R<sub>1</sub> выделяли по методике Остерхельта и Стокениуса [16, 17]. Биомасса бактерий была любезно предоставлена Л. Н. Чекулаевой. Количество бактериородопсина определяли спектрально, принимая  $\epsilon_{568}$  равной  $63\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [18].

Методика образования плоских искусственных мембран на коллоидной пленке, а также методика встраивания бактериородопсиновых бляшек в эту пленку были описаны ранее [9, 10]. Состав среды встраивания: 100 мМ NaCl, 2,5 мМ EDTA, 50 мкг/мл бактериородопсина, pH 6,0.

Образование электрической разности потенциалов в исследуемых системах измеряли посредством вибрирующего золотого электрода или хлорсеребряного электрода, соединенного через агаровый мостик с насыщенным KCl со слоем деканового раствора азолектина. Хлорсеребряный электрод сравнения вводился в водную фазу через агаровый мостик. При использовании погруженного электрода, вводимого в липидную фазу, моделируются условия, характерные для обычных плоских искусственных липидных мембран, так как вторая граница раздела липид — вода образуется в зоне контакта агарового мостика погруженного электрода с липидной фазой. Измерения вибрирующим и погруженным электродами прово-

Основные узлы и принципы действия установки с вибрирующим электродом были аналогичны ранее описанным установкам [19, 20]. Вибрирующий электрод представлял собой золотой диск толщиной 0,5 мм и диаметром 10 мм, приклеенный через стержень из органического стекла к подвижной катушке динамического громкоговорителя. Измерительная кювета была изготовлена из стекла марки «пирекс». Диаметр кюветы 40 мм, высота 15 мм. Кювета имеет два отростка, один из которых используется для электрода сравнения, а другой — для внесения добавок в водную фазу. Освещение кюветы проводилось через водную фазу.

В системе декановый раствор азолектина — вода обычно водная фаза представляла собой 50 мМ трис-HCl, pH 7,4; 1,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 50 мкг/мл бактериородопсина, а липидная фаза — 2 мг азолектина в 1 мл декана.

Для получения фотоответов в системе, где декановая фаза не содержала фосфолипидов, фиолетовые бляшки предварительно обрабатывали од-

ним из следующих трех способов: 1) озвучивали в течение 20 с на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 на мощности 0,5; 2) растирали в стеклянном гомогенизаторе или 3) бляшки добавляли в водную фазу двухфазной системы декан — вода, после чего золотой вибрирующий электрод (частота вибрации 120 Гц, амплитуда колебаний 1 мм) приводили в соприкосновение с декановой фазой на 1—2 мин; по завершении обработки золотой электрод тщательно промывался.

В работе использовали следующие реактивы: трис (основание), азолектин (суммарная фракция фосфолипидов из соевых бобов) и ХКФ (Sigma); MES (Merck); грамицидин А (Calbiochem); дважды перекристаллизованный  $\text{CaCl}_2$ ; декан марки х. ч.; воду трижды перегоняли, причем одну из перегонок проводили с марганцевокислым калием и серной кислотой. Аппарат для перегонки воды был изготовлен из стекла марки «пирекс». Фосфатидилхолин выделяли из азолектина по методике, описанной Даусоном [21]. *Полностью-транс*-ретинол был любезно предоставлен А. А. Дмитриевским.

В качестве источника постоянного света использовали осветитель ОИ-28 с кварцевой галогенной лампой КГМ 24 мощностью 150 Вт. Максимальная интенсивность света на границе липид — вода была около 50 мВт/см<sup>2</sup>.

При измерении спектров действия использовали интерференционные и нейтральные фильтры. Область пропускания и коэффициент пропускания фильтров определяли на спектрофотометре Hitachi 124. Энергию света измеряли посредством измерителя энергии ИЭК-1. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS.

Эта работа выполнена в рамках исследовательской программы «Родопсин», организованной АН СССР и МГУ (руководитель программы акад. Ю. А. Овчинников).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богуславский Л. И., Бойцов В. Г., Волков А. Г., Козлов И. А., Метельский С. Г. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1125—1130.
2. Hwang S.-B., Korenbrot J., Stoeckenius W. (1977) *J. Membrane Biol.*, **36**, 137—158.
3. Hwang S.-B., Korenbrot J., Stoeckenius W. (1977) *J. Membrane Biol.*, **36**, 115—135.
4. Варский Е. А., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Кондрашин А. А., Либерман Е. А., Остроумов С. А., Самуилов В. Д., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 113—126.
5. Drachev L. A., Frolov V. N., Kaulen A. D., Liberman E. A., Ostroumov S. A., Plakunova V. G., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059—7065.
6. Skulachev V. P. (1976) *FEBS Lett.*, **64**, 23—25.
7. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Кондрашин А. А., Либерман Е. А., Немечек И. Б., Остроумов С. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П., Ясайтис А. А. (1974) *Докл. АН СССР*, **218**, 481—484.
8. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Liberman E. A., Nemecsek I. B., Ostroumov S. A., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. (1974) *Nature*, **249**, 321—324.
9. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. (1977) *Молекулярная биология*, **11**, 1377—1387.
10. Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P. (1978) *FEBS Lett.*, **87**, 161—166.
11. Drachev L. A., Frolov V. N., Kaulen A. D., Kondrashin A. A., Samuilov V. D., Semenov A. Yu., Skulachev V. P. (1976) *Biochim. et biophys. acta*, **440**, 637—660.
12. Войццкий В. М., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П. (1979) *Докл. АН СССР*, **245**, 726—729.
13. Andreoli T. E., Tosteson D. C. (1971) *J. Gen. Physiol.*, **57**, 526—533.
14. Овчинников Ю. А., Иванов В. Г., Шкроб А. М. (1974) *Мембраноактивные комплексы*, «Наука», М.
15. Mathies R., Stryer L. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2169—2176.
16. Oesterheld D., Stoeckenius W. (1971) *Nature New Biol.*, **233**, 149—152.
17. Oesterheld D., Stoeckenius W. (1974) *Methods Enzymol.*, **31**, 667—678.
18. Oesterheld D., Stoeckenius W. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **37**, 316—326.
19. Бойцов В. Г., Богуславский Л. И. (1966) *Электрохимия*, т. II, вып. 3, 377—379.

20. Бабаков А. В., Мягков И. В., Сотников П. С., Терехов О. П. (1972) Ж. физ. химии, т. XLVI, № 7, 1873-1876.  
21. Dawson R. M. C. (1963) Biochem. J., 88, 414-425.

Поступила в редакцию  
1.XII.1978

После доработки  
14.III.1979

## THE PHOTOELECTRICAL RESPONSES OF BACTERIORHODOPSIN IN LIPID — WATER SYSTEMS

VOJTSITSKY V. M., DRACHEV I. A., KAULEN A. D., SKULACHEV V. P.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic  
Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Generation of light-driven electrical potential difference across lipid-water interface was investigated in three model systems containing bacteriorhodopsin. The fast photoeffect in the system «asolectin solution in decane — water» is similar to photoeffect of bacteriorhodopsin incorporated into a planar lipid membrane or into a collodion film impregnated with phospholipid. The photoeffect is greatly decreased by protonophores, as well as by gramicidin A in the presence of  $K^+$  or  $Na^+$ . The similar photoeffect was found in biphasic system introduced by Hwang, Korenbrot and Stoeckenius. However, in this case protonophores increase the amplitude of photoeffect in low and decrease in high concentrations. Phenylidicarbauncaborane anion has the similar effect. In the system «decane — water» the slow photoeffect can be measured with vibrating electrode placed above the decane phase, but not with the electrode connected with this phase through an agar bridge. In the latter system the photoeffect is observed not only with bacteriorhodopsin but also with retinal.

---