

Д. И. САПОЖНИКОВ

## ПОЛУЧЕНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ФОТОХРОМОПРОТЕИДА

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 18 VIII 1948)

Работами В. Н. Любименко (1, 2) было доказано, что фитохромы пластиды (каротин, ксантофилл, хлорофилл а и хлорофилл б) находятся в ней в химической связи с протеинами, образуя фитохромопротеидный комплекс. Белки цитоплазмы не отличаются по своему аминокислотному составу от белков пластид. Однако почти все липоиды клетки содержатся в пластиде. Поэтому можно с большой долей вероятности считать, что белки пластид являются липопротеинами. Любименко впервые удалось выделить такой фитохромопротеидный комплекс из листьев аспидистры и функии. В предыдущей работе (3) нам удалось показать, что этот фитохромопротеидный комплекс (натуральный хлорофилл по Любименко) обладает способностью к фоторедукции азотнокислого серебра. Далее мы поставили себе задачу получить искусственным путем фитохромопротеидный комплекс, который обладал бы такую же фотохимическую активностью, как комплекс из аспидистры.

В качестве липопротеинового носителя мы выбрали зернистые включения желтка куриного яйца, которые носят название желточных зерен. В желтке различают двоякого рода желточные зерна: желтые и белые. Желтые желточные зерна имеют больший удельный вес и поэтому могут быть хорошо отделены от белых желточных зерен путем многократного отмучивания в высоких стеклянных цилиндрах. Желтые зерна обладают следующими характерными особенностями. Под микроскопом они представляют собой почти правильные шары размером около одного микрона. При  $pH = 10$  происходит лизис этих зерен с образованием прозрачного опалесцирующего раствора желтоватого цвета. Спектроскопирование этого раствора обнаруживает характерные полосы поглощения ксантофилла (лютеина). При воздействии ацетона происходит коагуляция, денатурация и переход ксантофилла в ацетоновый раствор. Зерна можно также растворять и в нейтральной среде, если прибавить к их суспензии несколько капель насыщенного раствора хлористого натрия.

„Посадка“ фитохромов на липопротеиновый комплекс совершалась двояким путем: 1) фитохромы „сажались“ на уже лизированные зерна, 2) они сажались на еще не лизированные зерна с последующим растворением полученных таким образом „искусственных гран“.

После испытания нескольких способов мы остановились на следующем. Свежие листья сныти (*Aegopodium podagraria* L.) растираются на мясорубке. К полученной таким образом густой массе прибавляют равное по весу количество 50% раствора ацетона. После

встряхивания с ацетоном последний отсасывается на воронке Бюхнера. Оставшаяся масса обрабатывается 80% ацетоном (в двойном по весу количестве). Получается темнозеленый раствор всех фитохромов в ацетоне.

Фитохромы затем переводятся в петролейный эфир, последний отмывается от ацетона водой, после чего сушится при помощи сернокислого натрия. После обезвоживания этого раствора им пропитывается фильтровальная бумага. Петролейному эфиру дают улетучиться в темной комнате. Небольшие кусочки бумаги помещаются в литровую колбу с липопroteinом (либо в виде раствора, либо в виде суспензии) и встряхиваются 3—4 часа на трясушке.

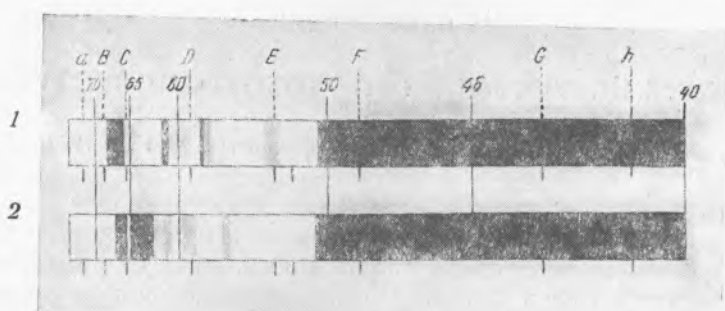


Рис. 1. Спектры поглощения фитохромопротеида: 1 — до изменения, 2 — после изменения

Ниже приводится описание примерного опыта по получению искусственного фитохромопротеида.

Два яичных желтка отмываются в скорлупе от белка большим количеством воды. У подвешенного на халазах (градинки) желтка прокалывается пинцетом оболочка и желтку дают стечь в высокий цилиндр с водой. Желтки сильно встряхиваются в цилиндре, после чего последний ставится в темноту. После того как осядут желтые зерна (через 1—2 часа), декантируют воду, наливают новую порцию воды и снова встряхивают. Эта операция повторяется 7—8 раз. После последней декантации суспензию желтых зерен переводят в литровую колбу, добавляют 200 мл дистиллированной воды и насыпают фильтровальные бумажки, пропитанные фитохромами. Колба помещается на трясушку и встряхивается 2—3 часа. Параллельный опыт ведется на желточных зернах, лизированных при  $\text{pH} = 10$ .

После 2—3-часового встряхивания в первой колбе получается зеленая суспензия зерен фитохромопротеида, а во второй — темнозеленый раствор фитохромопротеида. Раствор этот довольно хорошо фильтруется через бумажный фильтр.

Если в первую колбу с суспензией добавить фосфатный буфер при  $\text{pH} = 10$ , то происходит лизис фитохромопротеидных зерен с образованием зеленого раствора фитохромопротеида.

Полученные таким образом растворы фитохромопротеида обладают фотохимической активностью, о чем можно судить по восстановлению ими азотнокислого серебра на свету.

Для демонстрации фотохимической активности полученного искусственного фитохромопротеида мы поступили таким же образом, как и в предыдущей работе (3).

К раствору фитохромопротеида был прибавлен равный объем 0,1%  $\text{AgNO}_3$ . Одна порция полученного раствора была помещена в темноту, а другая порция выставлена на свет. Порция, находившаяся

в темноте, оставалась зеленой в течение многих суток, не меняя своей окраски. Та же порция, которая была выставлена на свет, побурела уже через 30 мин. от выпавшего серебра.

При спектроскопировании растворов фитохромопротеида мы обнаружили разницу в спектрах между фитохромопротеидами, полученными двумя вышеуказанными способами.

Раствор фитохромопротеида, полученный лизисом зеленой суспензии (раствор № 1), обладал обычным спектром, несколько сдвинутым в сторону красных лучей (рис. 1, I). Раствор же фитохромопротеида, полученный путем посадки хлорофилла на лизированные зерна (раствор № 2), обладал спектром, характерным для хлорофилла b (рис. 1, 2),

Исследуя это явление, мы обнаружили, что при стоянии раствора № 1 он перетерпевает изменения в спектре поглощения, выражающиеся в постепенном ослаблении полосы с максимумом около 660 м $\mu$  и появлением и усилением полосы с максимумом около 640 м $\mu$ . При проверке этого явления с помощью объективного спектрофотометра Бекмана мы получили подтверждение изменения спектров (см. кривые I и II рис. 2).

Для того чтобы иметь возможность по желанию следить за этим процессом, мы готовим зеленую суспензию, растворяем ее с помощью хлористого натрия и затем приводим к желательному рН. Таким путем было установлено, что изменение спектра фитохромов совершается в темноте, но значительно ускоряется на свету.

В настоящей статье мы приводим лишь данные предварительных опытов. Подробное описание и данные количественного исследования будут опубликованы позднее.

В заключение приношу благодарность проф. В. А. Бриллиант за ценные советы, которыми я пользовался на всех этапах этой работы. Пользуюсь случаем выразить благодарность также проф. В. С. Шапотову и Б. П. Головину, благодаря любезности которых были выполнены кривые спектров.

Ботанический институт  
им. В. Л. Комарова  
Академии Наук СССР

Поступило  
16 VII 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

<sup>1</sup> В. Н. Любименко, Дневн. I Всерос. съезда русских ботаников, 1923, 45—45. <sup>2</sup> В. Н. Любименко, Изв. Росс. Акад. Наук, 129 (1923). <sup>3</sup> Д. И. Сапожников, ДАН, 61, № 3 (1948).

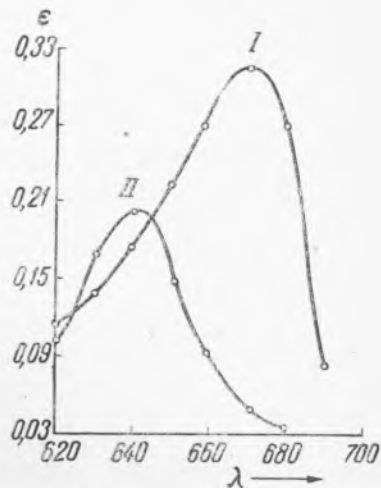


Рис. 2. Кривые поглощения света фитохромопротеидом: I — до изменения, II — после изменения