



УДК 577.212.3

Выделение и идентификация нового белка из спикул пресноводной губки *Baicalospongia bacillifera*

И. Г. Кондратов¹, И. С. Соловаров¹, Н. Н. Деникина¹, О. Г. Лопатовская²,
С. И. Беликов¹

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

² Иркутский государственный университет, Иркутск

E-mail: kondratovig@mail.ru

Аннотация. Процессы биосилификации (отложения кремния живыми организмами) на данный момент широко освещены для диатомовых водорослей. Среди многоклеточных организмов губки являются единственными представителями, способными к отложению биогенного кремнезема. До настоящего времени было аннотировано наличие четырёх белков в спикулах байкальской губки *Lubomirskia baicalensis*. Комплекс этих белков (силикатеинов) формирует аксиальный филамент спикул, вокруг которого происходит отложение биогенного кремнезёма. Сравнительный электрофоретический анализ белков аксиального филамента байкальских губок *Baicalospongia bacillifera* и *L. baicalensis* показал наличие нового белка в спектре *B. bacillifera*. С помощью масс-спектрометрического анализа доказано существование нового белка с массой 62 kDa в спикулах байкальской губки *B. bacillifera*. Показано, что он не является прекурсором ранее описанных белков спикул губок – силикатеинов. Высказано предположение о его роли в процессе биосилификации при формировании спикул губок.

Ключевые слова: байкальские губки, белки спикул, биосилификация, силикатеин, масс-спектрометрический анализ.

Введение

Губки (Porifera, или Spongia) являются единственными современными многоклеточными организмами, способными формировать свой скелет из кремния. В спикулах морских губок были найдены белки, обладающие ферментативной активностью и способные гидролизовать эфиры кремниевой кислоты с образованием аморфного кремнезёма [3; 4; 7; 8]. Эти белки, получившие название силикатеины, входят в состав аксиального филамента, вокруг которого происходит отложение кремнезёма и формирование скелетных элементов губок – спикул [6; 7]. В пресноводных губках также обнаружены белки, гомологичные силикатеинам морских губок: известны четыре изоформы силикатеина-α для космополитной пресноводной губки *Ephydatia fluviatilis* и эндемичной байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* [3; 5].

Однако, кроме силикатеинов, входящих в аксиальный филамент, в формировании спикул могут участвовать и другие белки. Объектом наших исследований стала губка *Baicalospongia bacillifera*, поскольку белки спикул для неё не охарактеризованы. Кроме того, спи-

кулы *B. bacillifera* и *L. baicalensis* значительно отличаются по форме и размерам: спикулы первой представляют собой крупные стронгили с шипами, собранными на закругленных концах, размерами 170–365×16–40 мкм, в то время как для *L. baicalensis* характерны сравнительно тонкие амфиоксы 193×13 мкм [2]. Эти различия могут быть обусловлены разным белковым составом. Цель исследований – анализ белков спикул *B. bacillifera*.

Материалы и методы

Сбор образцов губок проводили в прибрежье бух. Большие Коты (Южный Байкал) с глубин более 8 м. Препараты спикул получали путём растворения тканей губки в смеси HNO₃/H₂SO₄ (1:4) [7]. Для выделения белков спикул использовали модифицированный метод [7]: 2 г спикул растворяли в 150 мл смеси 2M HF и 8M NH₄F (pH 5) в течение 12 ч, затем раствор диализовали против 1 л дистиллированной воды при 4 °C со сменой воды каждые 40 мин. Нерастворимые белки отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 10 000 об/мин и затем хранили при -20 °C.

Препарат белка анализировали методом денатурирующего гель-электрофореза согласно методике [1]. После проведения электрофореза гель окрашивали красителем Кумасси (Coomassie brilliant blue G-250) [1].

Фрагменты геля с пятнами белков вырезали, помещали в несиликонизированные пробирки и трижды по 30 мин отмывали раствором: ацетонитрил 50 %; NH_4HCO_3 25 мМ. Затем гель 15 мин дегидратировали в ацетонитриле и 40 мин сушили при комнатной температуре. К высушенным фрагментам геля добавляли раствор трипсина (Promega) 0,005 мг/мкл в 25 мМ NH_4HCO_3 , инкубировали при 4 °С до полного впитывания раствора в гель, после чего смесь на 12 ч помещали в термостат при 37 °С. По завершении гидролиза пробы 40 мин

экстрагировали раствором 1%-ной трифторуксусной кислоты при 20 °С.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Ultraflex (Bruker Daltonix) в режиме линейных масс в диапазоне детекции 700–3500 Da. Данные анализировали с помощью пакета программ Flex Analysis.

Результаты и обсуждение

В исследовании проанализированы белки, выделенные из спикул губки *B. bacillifera*. На электрофореграмме суммарного белка видно, что помимо уже известных для *L. baicalensis* белков с массами 20–26 kDa, у исследуемой губки присутствует дополнительная полоса, соответствующая 62 kDa (рис. 1, А).

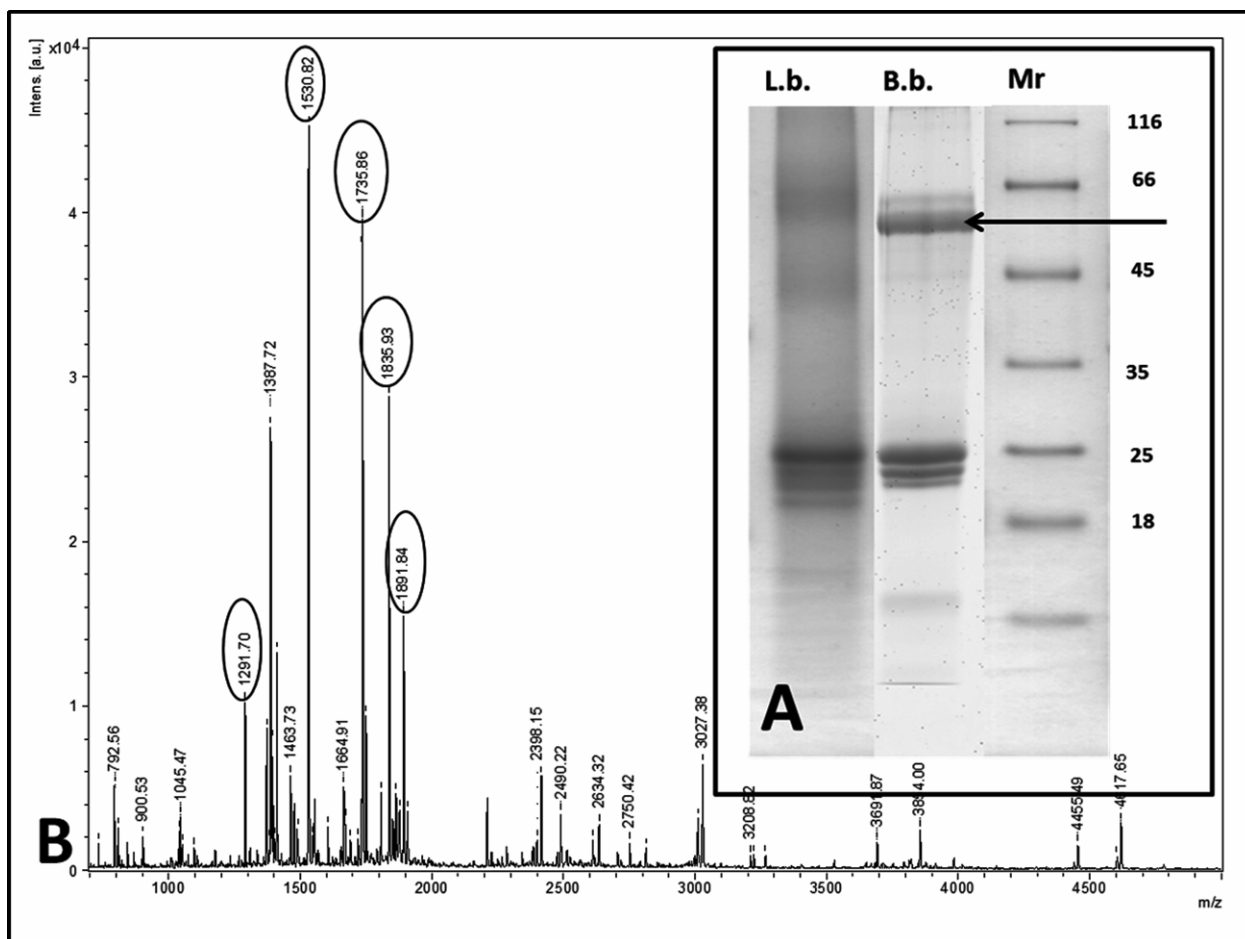


Рис. 1. А – Электрофоретическое сравнение тотального белка спикул губок *Lubomirskia baicalensis* (L.b.) и *Baikalospongia bacillifera* (B.b.). Mr – маркер молекулярного веса. Стрелкой указан белок с массой 62 kDa. В – Масс-спектрограмма трипсинового гидролизата белка с массой 62 kDa. Интенсивные пики с обведенными массами анализировали фрагментацией

Не вызывает сомнений, что данный белок либо входит в состав аксиального филамента данной губки, либо находится внутри кремниевого каркаса спикулы. Белки *B. bacillifera* с массами 20–26 kDa в масс-спектрометрическом анализе были определены как силикатеины, что свидетельствует об их высокой консервативности. Предположение, что белок с массой 62 kDa является непроцессированным предшественником одного из силикатеинов, не подтвердилось: масс, соответствующих пептидам силикатеина, в пептидном спектре белка 62 kDa не обнаружено (рис. 1, В). Этот факт свидетельствует, что в спикулах губки *B. bacillifera* обнаружен принципиально новый белок. Была предпринята попытка идентификации этого белка методом фрагментации и секвенированием de novo. Анализировали наиболее интенсивные пики (табл.). Фрагментацию проводили в режиме «Lift» при 50 % мощности лазера. Тем не менее, фрагментации оказались

подвержены не все пептиды. Массы родительских ионов и соответствующие им аминокислотные последовательности, определенные de novo, приведены в таблице.

Несмотря на высокую интенсивность пиков родительских ионов, достоверно идентифицировать удалось лишь пептид с массой 1835 Da, поскольку на N-конце четко идентифицировали отщепление иона с массой 128 Da (а. о. лизина), что соответствует его триптическому происхождению. Большинство пептидов не удалось идентифицировать из-за высокого содержания гидрофильных аминокислотных остатков, что часто приводит к неравномерным разрывам полипептидной цепи, как в случае с пептидом массой 1735 Da. На рис. 2 приведена масс-спектрограмма фрагментации этого пептида, где видно, что основной разрыв полипептидной цепи проходит в районе масс 1100 Da, в то время как остальные связи рвутся хуже.

Таблица

Выделенные из спикул губки *B. bacillifera* пептиды белка с массой 62 kDa и предсказанные аминокислотные последовательности ms/ms фрагментации

Масса родительского иона (MH ⁺), Da	Предсказанная аминокислотная последовательность
1291	ENELS (RNVASLENE)
1530	APTVLWGT (ETGWLVTPAVAD)
1735	RLAYAVSNHGDOPYGTD
1807	RRSWGWSVTWV
1835	WSWVTVTWEGVSSALK
1891	YAYLSS(XX)YAY

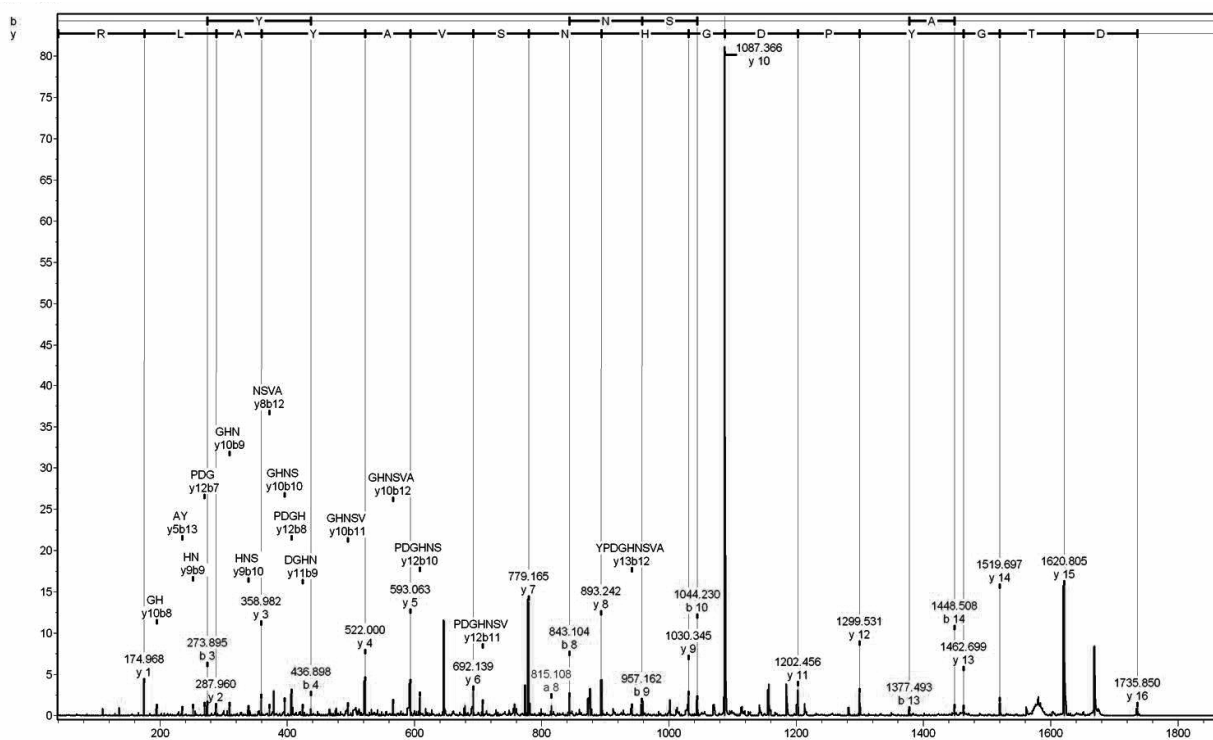


Рис. 2. Масс-спектрограмма MS/MS фрагментации пептида с массой 1735 Da

Поиск по гомологии в базах данных SwissProt и NCBI подтвердил, что белок с массой 62 kDa не является предшественником силикатина, однако идентифицировать его не позволил. Этот факт подтвердил существование в спикулах *B. bacillifera* нового белка, не имеющего аналогов в базах данных.

Заключение

В результате работы в спикулах байкальской губки *B. bacillifera* обнаружен новый белок, не являющийся изоформой известных белков силикатиннов. Принимая во внимание его локализацию, можно высказать предположение об участии данного белка в процессе биосилификации при формировании спикул губок.

Авторы выражают искреннюю благодарность М. В. Серебряковой (НИИ биомедицинской химии им. В. М. Ореховича РАН), осуществившей масс-спектрометрический анализ белков; И. В. Ханаеву и А. Е. Бормотову за сбор образцов губок.

Литература

1. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентри-

трифугирование / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 288 с.

2. Резвой П. Д. Пресноводные губки (сем. Spongillidae и Lubomirskiidae) / Фауна СССР. Губки. – М.; Л.: Изд. АН СССР, 1936. – Т. 2, вып. 2. – 125 с.

3. Dynamics of skeleton formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. Part I. Biological and biochemical studies / O. V. Kaluzhnaya [et al.] // Naturwissenschaften. – 2005. – Vol. 92. – P. 128–133.

4. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin / A. Krasko [et al.] // Europ. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267. – P. 4878–4887.

5. Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers for sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* / N. Funayama [et al.] // Zool. Sci. – 2005. – Vol. 22, № 10. – P. 1113–1122.

6. Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica / K. Shimizu [et al.] // PNAS. – 1998. – Vol. 95, N 11. – P. 6234–6238.

7. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro / J. N. Cha [et al.] // PNAS. – 1999. – Vol. 96, N 2. – P. 361–365.

8. Weaver J. C. Molecular Biology of Demosponge Axial Filaments and Their Roles in Biosilicification / J. C. Weaver, D. E. Morse // Microsc. Res. Techniq. – 2003. – Vol. 62. – P. 356–367.

Isolation and identification of a new protein from freshwater sponge *Baicalospongia bacillifera* spicules

I. G. Kondratov¹, I. S. Solovarov¹, N. N. Denikina¹, O. G. Lopatovskaya¹, S. I. Belikov¹

¹ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

² Irkutsk State University, Irkutsk

Abstract. Biosilicification processes (deposition of silicon by living organisms) is currently widely described for diatoms. Among multicellular organisms only sponges are the capable of biogenic silica deposition. Four annotated proteins from axial filament Baikal sponge spicules *Lubomirskia baicalensis* described. This complex of proteins (silicateines) forms an axial filament of spicules around which the deposition of biogenic silica. Comparative electrophoretic analysis of proteins from the axial filaments Baikal sponges *Baicalospongia bacillifera* and *L. baicalensis* showed the presence of a new protein in the spectrum of *B. bacillifera*. Using mass spectrometry analysis proved the existence of a new protein with a mass of 62 kDa in the Baikal sponge *B. bacillifera* spicules. It is shown that it is not a precursor to the previously described protein sponge spicules – silicateines. It is suggested their roles in the biosilicification during sponge spicules formation.

Key words: Baikal sponges, spicules proteins, biosilicification, silicatein, mass-spectrometric analysis.

Кондратов Илья Геннадьевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42–84–22
E-mail: igkondratov@mail.ru

Kondratov Ilya Gennadyevich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology
senior research scientist
phone: (3952)42–84–22
E-mail: igkondratov@mail.ru

Соловаров Иннокентий Сергеевич
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
научный сотрудник
тел. (3952) 42–84–22
E-mail: keschass@mail.ru

Деникина Наталья Николаевна
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42–84–22
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Лопатовская Ольга Геннадьевна
Иркутский государственный университет
664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
кандидат биологических наук, доцент
тел. (3952) 24–18–70, факс (3952) 24–05–59
E-mail: lopatovs@gmail.com

Беликов Сергей Иванович
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская
доктор биологических наук, профессор
тел. (3952) 42–84–22, факс (3952) 42–54–05
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com

Solovarov Innokentiy Sergeevich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
research scientist
phone: (3952)42–84–22
E-mail: keschass@mail.ru

Denikina Nataliya Nikolaevna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology
senior research scientist
phone: (3952)42–84–22
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Lopatovskaya Olga Gennadyevna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
Ph. D. in Biology, ass. prof
phone: (3952) 24–18–70, fax: (3952) 24–05–59
E-mail: lopatovs@gmail.com

Belikov Sergey Ivanovich
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
D. Sc. of Biology, Prof., Head of laboratory
phone: (3952)42–84–22, fax: (3952) 42–54–05
E-mail: sergeibelikov47@gmail.com