

CHARAKTERIZACE PROTEOMU BAKTERIOFÁGA 812

ZBYNĚK ZDRÁHAL^a, LUDĚK EYER^b,
HANA KONEČNÁ^a a JAN PREISLER^c

^aLaboratoř funkční genomiky a proteomiky, ^bKatedra genetiky a molekulární biologie, ^cKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 2, 611 37 Brno
preisler@chemi.muni.cz

Došlo 5.9.05, přijato 26.10.05.

Klíčová slova: bakteriofág, proteom, hmotnostní spektrometrie, gelová elektroforéza, anomální migrace

Úvod

Bakteriofág 812 je polyvalentní fág z čeledi *Myoviridae*, jehož hlavním hostitelem jsou kmeny druhu *Staphylococcus aureus*, avšak atakuje i jiné druhy rodu *Staphylococcus*. Jde o virulentního fága, po jehož adsorpci na povrchu bakteriální buňky a injekci fágové DNA nastává lytický cyklus končící lyzí hostitelské buňky. *Staphylococcus aureus* je původcem závažných onemocnění ptáků a savců, mezi nimi i člověka. Vyvolává především infekce kůže, podkoží a přilehlých struktur, kostí, kloubů a dýchacích cest jako sekundární infekce po virové chřipce. Je hlavním původcem těžkých pooperačních komplikací u pacientů s ortopedickými implantáty, katetry, u pacientů s AIDS a novorozenců. Výše popsané charakteristiky činí fága 812 vhodným kandidátem pro fágovou terapii, při níž jsou bakteriofágy používány pro léčbu bakteriálních infekcí. Dnes se o fágové terapii uvažuje jako o alternativním způsobu léčby infekcí vyvolaných bakteriemi rezistentními k antibiotikům. Fágová terapie nabízí oproti léčbě antibiotiky vyšší specifitu, selektivní aplikaci v místě infekce, absenci nežádoucích účinků a rychlou selekci nových fágů v případě rezistence. O aktuálnosti fágové terapie svědčí např. i nedávné testy přípravků obsahujících fága K (cit.¹), který je blízký příbuzný fága 812.

Z hlediska účinnosti fágové terapie je nejvýznamnější charakteristikou rozmezí hostitelů; jako slibné se jeví zejména použití virulentních a polyvalentních fágů s širokým rozmezím hostitele. V současné době je studován vztah rozdílu genomu u standardního typu fága 812, jeho mutantů^{2,3}, příbuzných fágů K (cit.⁴), Twort, SK311, U16, 131 (cit.^{3,5}) a listeriového fága A511 (cit.⁶) k jejich odlišnému hostitelskému rozmezí.

Další možnosti studia odlišnosti fágů nabízí proteomická analýza. Tato práce si klade za cíl charakterizovat proteom standardního typu fága 812. Bude tak položen

základ pro porovnání standardního typu fága 812 s jeho mutanty a příbuznými fágy na úrovni proteinového complementu genomu. K analýze proteinů fága 812 je použito jak kombinace jednorozměrné gelové elektroforézy s peptidovým mapováním s použitím MALDI MS (cit.^{7,8}), tak i vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-ESI MS/MS)^{9,10}.

Experimentální část

Příprava vzorku bakteriofága

Fágové částice byly izolovány ultracentrifugací fágového lyzátu a čištěním v gradientu CsCl (cit.¹¹). Nízkomolekulární látky byly odstraněny dialýzou proti vodě. Fágová DNA, způsobující nadměrnou viskozitu suspenze vzorku, byla odstraněna enzymovým štěpením DNase I. Po zahuštění na vakuově odparce byly proteiny podrobeny redukci a tepelné denaturaci ve vzorkovém pufru¹².

Separace

Základní technikou použitou k separaci směsi proteinů fága byla jednorozměrná gelová elektroforéza (SDS-PAGE) s následnou analýzou MALDI MS, resp. MALDI TOF/TOF MS. Alternativně byla použita také separace peptidů vzniklých enzymovým štěpením kapilární chromatografií spojenou on-line s ESI MS.

Vertikální SDS-PAGE proběhla na aparatuře Protean II (Bio-Rad) v 15% (resp. 7,5%) gelu za konstantního proudu. Rozměry gelu byly 16 × 20 cm a jeho tloušťka 1 mm. Proteiny byly barveny barvivou Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad) nebo ProteoSilver Plus (Sigma-Aldrich). Gely byly skenovány kalibrovaným densitometrem GS-800 (Bio-Rad).

K separaci HPLC byl použit kapilární chromatograf (LC Packings) skládající se z gradientové pumpy (Ultimate), autosampleru (Famos) a jednotky pro přepínání kolon (Switchos). Vzorek (10 µl) byl nejprve zkoncentrován a odsolen na předkoloně (PepMap C18, 0,3 mm × 1 mm, 5 µm, LC Packings). Průtoková rychlost byla 10 µl min⁻¹. Vlastní separace byla provedena na kapilární koloně (0,32 mm × 175 mm) naplněné sorbentem Jupiter Proteo C12 (4 mm, Phenomenex) dle postupu popsaného v literatuře¹³. Průtoková rychlost separace byla 4 µl min⁻¹. Mobilní fáze A obsahovala 5 % acetonitrilu (ACN) a 0,1 % kyseliny mravenčí (FA), mobilní fáze B pak 80 % ACN a 0,1 % FA. Gradientová eluce začínala na 5 % fáze B po dobu 5 min, pak se podíl fáze B zvyšoval na 50 % od 5. do 53. min a nakonec až na 70 % během dalších 2 min.

Proteolytické štěpení

Vybrané proužky byly vyříznuty skalpelem a proteolyticky naštěpeny trypsinem (Sequencing Grade Modified

Trypsin, Promega) upraveným postupem dle Havliša a spol.¹⁴. Po odbarvení a vysrážení acetonitrilem byl gel hydratován 45 min při 4 °C v roztoku trypsinu (5 ng μl^{-1}) v 25 mM uhličitanu amonném a poté vystaven proteolýze po dobu 8 h při 37 °C. Po skončení štěpení byl volný roztok oddělen a gel byl extrahován směsí 5% kyseliny mravenčí a acetonitrilu (1 : 1, v/v). Roztok a extrakt byly spojeny. U vzorků určených pro analýzu HPLC-MS/MS byl odstraněn acetonitril centrifugací za vakua. Přídavkem roztoku kyseliny mravenčí (0,1%) bylo upraveno pH vzorku na hodnotu 3,0.

Hmotnostní spektrometrie

Vzorky byly po separaci gelovou elektroforézou štěpeny a analyzovány metodou MALDI MS. Vybrané vzorky, stejně tak jako štěpený vzorek celkové směsi proteinů fága, byly analyzovány pomocí HPLC-MS/MS.

Analýza MALDI MS byla provedena na hmotnostním spektrometru Reflex IV (Bruker). Jako matrice byl použit nasycený roztok 4-hydroxy- α -kyano-skořicové kyseliny ve směsi 50% ACN a 0,1% TFA (aq). Vzorky byly smíchány s matricí v poměru 1 : 3. Na vzorkovací destičku bylo nanášeno 0,6 μl připravené směsi vzorku s matricí. V případě potřeby byly vzorky před analýzou odsoleny na mikrošpičkách ZipTip C18 (Millipore). Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním modu. K externí kalibraci byla použita směs 5 peptidů v hmotnostním rozsahu 660 až 2564 Da. Spektra pak byla vyhodnocena s použitím programů XTOF 1.5 a Biotoools 2.0 (Bruker).

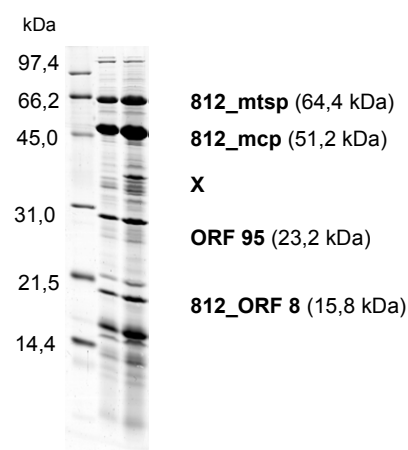
Analýza MALDI TOF/TOF MS byla provedena na hmotnostním spektrometru 4700 Proteomics Analyzer (Applera). Spektra byla měřena v pozitivním modu, jako kolizní plyn byl použit He. Výběr prekurzoru byl omezen na 15 iontů s nejvyšším signálem. Data MS/MS byla vyhodnocena programem GPS Explorer Workstation.

K analýze HPLC-MS/MS byl použit hmotnostní spektrometr s iontovou pastí Esquire 2000 (Bruker) vybavený ortogonálním elektrosprejem. Přístroj pracoval v pozitivním modu za podmínek běžných pro analýzu peptidů. Spektra MS/MS byla měřena v režimu automatického sběru dat Auto MS(n). Data byla zpracována s použitím programů DataAnalysis 3.0 a Biotoools 2.0 (Bruker).

Identifikace proteinů pomocí peptidového mapování, resp. MS/MS dat byla provedena programem MASCOT (Matrix Science). Povolena odchylka hmotnosti byla v případě MALDI MS dat v rozsahu 40–100 ppm, pro MS/MS data 1,5 Da pro hmotnost peptidu a 0,8 Da pro fragmenty a pro TOF/TOF data 50 ppm pro hmotnost peptidu a 0,5 Da pro fragmenty. K prohledávání byla použita jediná proteinová databáze vzniklá překladem dostupných úseků DNA fága 812 (cit.^{3,11}), jednak proteinová databáze fága K (cit.⁴), která je již v současné době včleněna do databáze NCBI. Využití databáze fága K k identifikaci proteinů fága 812 umožnil vysoký stupeň podobnosti genomů obou fágů jak na úrovni sekvenční homologie, tak i na úrovni organizace genomu.

Výsledky a diskuse

Genom fága 812 (146 kbp) obsahuje cca 100 putativních otevřených čtecích rámců. Přibližně polovina proteinů není zabudována do struktury fágové částice a tedy pravděpodobně není přítomna v připraveném vzorku. Vzhledem k jednoduchosti systému byla proto zvolena jako základní metoda separace proteinů fága 812 jednorozměrná gelová elektroforéza. Po nezbytné optimalizaci separace a obarvení Coomassie Blue byl získán gel s cca 40 odděle-

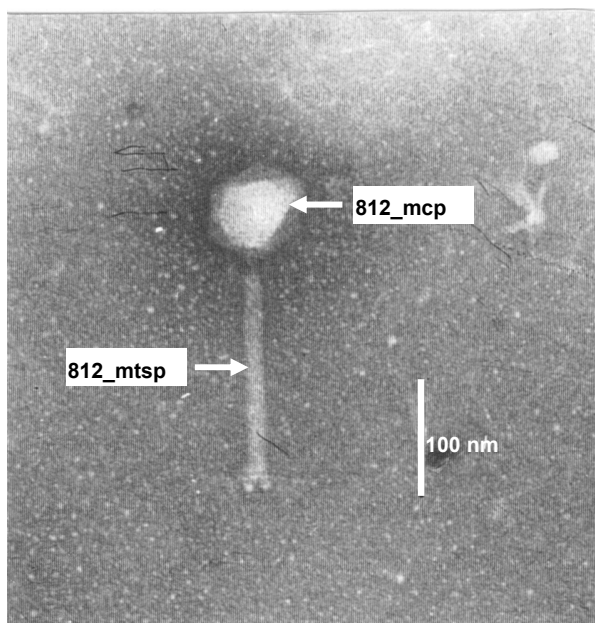


Obr. 1. Gelová elektroforéza proteinů bakteriofága 812; popísem jsou označeny majoritní proteiny, které byly identifikovány; X označuje proužek obsahující fragmenty proteinu 812_mtsp (viz diskuse v textu a obr. 4); gel byl obarven Bio-Safe Coomassie G 250

Tabulka I
Identifikované proteiny bakteriofága 812

<i>M</i> [kDa]	Identifikovaný protein		Pokrytí sekvence [%]
	fág 812 ^a	fág K ^b	
143,7		ORF 55	21
129,0		ORF 65	45
64,4	812_mtsp ^c	ORF 49 ^c	59
51,2	812_mcp ^c	ORF 44 ^c	67
50,4		ORF 68	34
39,2		ORF 62	20
23,2		ORF 95 ^c	72
17,8		ORF 96	34
19,2		ORF 64	69
15,9	812_ORF 8 ^c	ORF 50 ^c	87
12,2		ORF 52	23

^{a,b} V sloupcích označených fág 812 a fág K jsou uvedeny proteiny podle databáze použité při identifikaci; ^c proteiny identifikované také HPLC-MS/MS ze štěpeného vzorku celkové směsi proteinů fága; *M* – je molekulová hmotnost vypočtená z proteinových databází fágů; pokrytí sekvence bylo získáno peptidovým mapováním

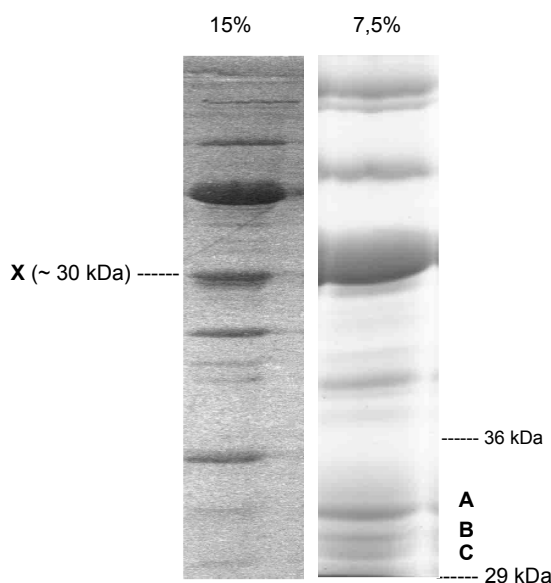


Obr. 2. **Bakteriofág 812**; na snímku získaném elektronovou mikroskopií je znázorněno umístění dvou majoritních proteinů v kapsidu a bičíku fága

nými proužky v rozmezí 10–150 kDa (obr. 1). Vybrané proužky byly vyříznuty, vystaveny působení trypsinu a získané peptidy byly podrobeny MS analýze. Peptidovým mapováním bylo identifikováno 11 proteinů (tab. I). Vedle dvou majoritních strukturálních proteinů, hlavního kapsidového proteinu, 812_mcp, a hlavního proteinu bičíkové pochvy, 812_mtsp (obr. 2), bylo nalezeno dalších 7 proteinů, které lze pravděpodobně zařadit do skupiny strukturálních proteinů na základě jejich homologie s proteiny příbuzných fágů. Zbývajícím dvěma nalezeným proteinům nebyla tímto způsobem přiřazena žádná funkce⁴. Pokud byla hodnota skóre při peptidovém mapování s použitím MALDI MS nižší než 80, byla pro potvrzení identity proteinů použita kapalinová chromatografie s online analýzou ESI MS/MS. Ve všech případech byly potvrzeny výsledky peptidového mapování.

HPLC-MS/MS byla také použita pro jednorozměrnou separaci a analýzu štěpeného vzorku celkové směsi proteinů fága. Zde se projevila nevýhoda analýzy v reálném čase s automatickou volbou mateřského iontu, kdy jsou přednostně fragmentovány peptidy majoritních proteinů. Metodu HPLC-MS/MS byly s jistotou identifikovány pouze 4 majoritní proteiny (tab. I).

Z obou jednorozměrných separačních technik použitých v této práci se tedy lépe osvědčila instrumentálně méně náročná klasická gelová elektroforéza. V současné době jsou ověřovány možnosti dvourozměrné separace s cílem rozšířit počet identifikovaných proteinů fága 812 zejména o důležité minoritní proteiny, jako je např. lytický enzym.



Obr. 3. **Srovnání separace fragmentů proteinu 812_mtsp na gelu 7,5% a 15%**; po optimalizaci separace byly získány místo jednoho proužku (X) tři oddělené proužky fragmentů proteinu (A, B, C). Proužek patrný těsně pod proužkem X na gelu 15% patří jinému proteinu; gel byl obarven barvivem Bio-Safe Coomassie G 250

Vedle proteinů, jejichž polohy na gelu odpovídaly jejich molekulovému hmotnostem, bylo nalezeno několik proužků, ve kterých byly identifikovány proteiny se značně vyšší hmotností. Až na jedinou výjimku bylo možno na základě nalezených peptidů soustředěných do určitých úseků usoudit, že jde o fragmenty těchto proteinů. U proužku v poloze odpovídající hmotnosti cca 30 kDa (obr. 3) byl však opakovaně identifikován celý hlavní protein bičíkové pochvy (812_mtsp) s dvojnásobnou molekulovou hmotností (64,4 kDa). Navíc tento protein byl spolehlivě identifikován v proužku se správnou polohou na gelu. Přestože odchylky v migraci při gelové elektroforéze jsou běžně pozorovány u proteinů, jako jsou např. histony nebo některé posttranslačně modifikované proteiny, odchylka molekulové hmotnosti určená z polohy proužku na gelu od molekulové hmotnosti činící cca 50 %, je neobvyklá. Proto byl tento jev podroben dalšímu studiu. Při separaci na gelu vhodnějším pro studovanou oblast (7,5 %) byly místo jednoho proužku pozorovány tři dobře separované proužky (obr. 3). Na základě peptidového mapování, potvrzeného MALDI TOF/TOF MS analýzou bylo zjištěno, že jde o fragmenty proteinu 812_mtsp o přibližně stejné molekulové hmotnosti (tab. II). V proužku A byly nalezeny peptidy z úseku 299–587, což odpovídá C-koncové polovině proteinu. V proužcích B a C byly nalezeny peptidy z úseku 2–257 odpovídající N-koncové polovině proteinu. Specifičtější analýza MALDI TOF/TOF MS nepotvrdila u proužku A ani jeden z peptidů pocházejících

Tabulka II

Pokrytí sekvence u fragmentů proteinu 812_mtsp

Vz. A

1 **MAVEPFRRP** ITRPHASIEV DTSGIGGSAG SSEKVFLIG QAEGGEPNTV
 51 YELRNYAQAK RLFRRSGELLD AIELAWGNSP NYTAGRILAM RIEDAKPASA
 101 EIGGLKITSK IYGNVANNIQ VGLEK**NTLS**D SLRLRVIFQD DRFNEVYDNI
 151 GNIFTIKYKG EEANATFSVE HDEETQKASR LVLKVGQEV KSYDLTGGAY
 201 DYTNAIITDI NQLPDFEAKL SPFGDKNLES SKLDKIENAN IKDKAVYVKA
 251 VFGDLEKQTA YNGIVSFEQL NAEGEVPSNV EVEAGEESAT VTATSPIKTI
 301 **EPFELTKLKG** **GTNGEPPATW** **ADKLDKFAHE** GGYIIVPLSS **KQSVHAEVAS**
 351 **FVKERSDAGE** **PMRAIVGGGF** **NESKEQLFGR** **QASLSNPRVS** **LVANSGETFVM**
 401 **DDGRKNHVPA** YMVAVALGGL ASGLEIGESI TFKPLRVSSL DQIYESIDL
 451 ELNENGIISI EFVRNRTNTF **FRIVDDVTF** **NDKSDPVKAE** **MAVGEANDFL**
 501 **VSELKVQLED** **QFIGTRTINT** **SASIKDFIQ** **SYLGRKKRDN** **EIQDFPAEDV**
 551 **QVIVEGNEAR** ISMTVYPIRS FKKISVSLVY KQQTQLQA

Vz. B

1 **MAVEPFRRP** ITRPHASIEV DTSGIGGSAG SSEKVFLIG QAEGGEPNTV
 51 YELRNYAQAK **RLFRRSGELLD** **AIELAWGNSP** **NYTAGRILAM** **RIEDAKPASA**
 101 **EIGGLKITSK** **IYGNVANNIQ** **VGLEKNTLS**D SLRLRVIFQD DRFNEVYDNI
 151 **GNIFTIKYKG** **EEANATFSVE** **HDEETQKASR** LVLKVGQEV KSYDLTGGAY
 201 DYTNAIITDI NQLPDFEAKL SPFGDKNLES SKLDKIENAN IKDKAVYVKA
 251 **VFGDLEKQTA** YNGIVSFEQL NAEGEVPSNV EVEAGEESAT VTATSPIKTI
 301 **EPFELTKLKG** **GTNGEPPATW** **ADKLDKFAHE** GGYIIVPLSS KQSVHAEVAS
 351 **FVKERSDAGE** **PMRAIVGGGF** **NESKEQLFGR** **QASLSNPRVS** **LVANSGETFVM**
 401 **DDGRKNHVPA** YMVAVALGGL ASGLEIGESI TFKPLRVSSL DQIYESIDL
 451 ELNENGIISI EFVRNRTNTF FRIVDDVTF NDKSDPVKAE MAVGEANDFL
 501 **VSELKVQLED** **QFIGTRTINT** **SASIKDFIQ** **SYLGRKKRDN** **EIQDFPAEDV**
 551 **QVIVEGNEAR** ISMTVYPIRS FKKISVSLVY KQQTQLQA

V tabulce jsou uvedeny výsledky jen pro proužek A a B (viz obr. 3). U proužku C byl získán takřka identický výsledek jako pro proužek B. Úseky sekvence získané peptidovým mapováním jsou vyznačeny tučně (MALDI MS) a úseky získané analýzou MS/MS fragmentů peptidů jsou vyznačeny podtržením (MALDI TOF/TOF MS)

z *N*-koncové poloviny proteinu, které byly určeny peptidovým mapováním (tab. II). Navíc byla metodou MALDI TOF/TOF MS ve vzorcích potvrzena přítomnost některých dalších peptidů vzniklých po štěpení trypsinem.

Zjištěné štěpení proteinu přibližně v jeho středu může souviset s jevem, který byl pozorován u proteinu bičíkové pochvy laktobacilového řádu LP65. Změny ve struktuře tohoto proteinu mohou souviset s kontrakcí bičíkové pochvy¹⁵. U některých bakteriofágů bylo též pozorováno posttranslační štěpení strukturních proteinů¹⁶. Dalšími experimenty je nutno s jistotou vyloučit možný vliv proteas, které mohou být přítomny ve vzorku řádu, resp. možnost tvorby fragmentů během izolace a čištění bakteriofágů.

Závěr

Efektivní použití fágové terapie v klinické praxi vyžaduje detailní znalosti fágového genomu a proteomu. V této práci byl poprvé charakterizován proteom standardního typu bakteriofága 812. Celkem bylo identifikováno 11 proteinů. Byly nalezeny všechny 4 proteiny identifikované v práci zabývající se studiem příbuzného řádu K (cit.⁴) a 7 dalších proteinů bylo identifikováno poprvé. V devíti případech jde pravděpodobně o strukturní proteiny, ve dvou případech není funkce proteinů známa.

Byla vysvětlena neobvyklá migrace hlavního bičíkového proteinu. Úpravou podmínek separace SDS-PAGE byla původní jediná zóna s migrací cca 30 kDa rozdělena na tři zóny, ve kterých byly nalezeny fragmenty výše uvedeného proteinu s přibližně stejnou molekulovou hmotností. Analýza TOF/TOF MS potvrdila výsledky získané peptidovým mapováním; byly nalezeny další peptidy zvyšující celkové pokrytí sekvence a vyloučeny chybně přiřazené peptidy. Jde pravděpodobně o peptidy pocházející z nspecifického štěpení fragmentů hovězího albuminu, který byl součástí kultivačního média použitého při přípravě vzorku řádu.

Při analýze relativně jednoduchého proteomu řádu se osvědčila kombinace jednorozměrné gelové elektroforézy a MALDI TOF MS, resp. TOF/TOF MS. Relativně nízký přínos HPLC-ESI MS/MS byl pravděpodobně způsoben neúplnou separací většiny peptidů a nedostatečnou rychlostí výběru mateřského iontu v reálném čase. Zlepšení výsledků HPLC-ESI MS/MS by vyžadovalo opakované experimenty za modifikovaných podmínek sběru dat (např. vyloučení iontů s již známými MS/MS spektry).

Identifikace proteinů položila základ pro budoucí porovnání proteomu řádu 812 s jeho blízkými příbuznými řády U16, SK311, 131 a Twort a s jeho mutanty s cílem zjistit, jak pozorované změny souvisejí s jejich odlišným rozmezím hostitele.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře ČR, projekt č. 203/03/0515. Autoři dále děkují prof. Barry L. Kargerovi, Tomáši Rejtarovi a Hsuan-shen Chenovi za možnost měření na TOF/TOF MS a za jejich pomoc s těmito experimenty a L. Valíčkovi z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství za zhotovení snímku fága 812.

LITERATURA

- O'Flaherty S., Ross R. P., Meaney W., Fitzgerald G. F., Elbreki M. F., Coffey A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1836 (2005).
- Rosypal S., Rosypalová A.: *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun.* 2, 105 (1972).
- Pantůček R., Rosypalová A., Doškař J., Kailerová J., Růžičková V., Borecká P., Snopková Š., Horváth R., Götz F., Rosypal S.: *Virology* 246, 241 (1998).
- O'Flaherty S., Coffey A., Edwards R., Meaney W., Fitzgerald G. F., Ross R. P.: *J. Bacteriol.* 186, 2862 (2004).
- Landthaler M., Shub D. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7005 (1999).
- Loessner M. J., Scherer S.: *J. Bacteriol.* 177, 6601 (1995).
- Pappin D. J. C., Hojrup P., Bleasby A. J.: *Curr. Biol.* 3, 327 (1993).
- Mann M., Hojrup P., Roepstorff P.: *Biol. Mass Spectrom.* 22, 338 (1993).
- Yates J. R. III., Eng J. K., McCormack A. L., Schieltz D.: *Anal. Chem.* 67, 1426 (1995).
- Lim H., Eng J., Yates J. R. III., Tollaksen S. L., Giometti C. S., Holden J. F., Adams M. W., Reich C. I., Olsen G. J., Hays L. G.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 957 (2003).
- Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Kašpárek P., Eyer L., Konečná H., Zdráhal Z., Preisler J.: *11th International Symposium on Staphylococci & Staphylococcal Infections, Charleston, 2004*. Plenary Summaries & Poster Abstracts, str. 201. Charleston 2004.
- Garfin D. E., v knize: *Guide to Protein Purification*, (Deutscher M. P., ed.) ze série *Methods in Enzymology*, sv. 182, str. 430. Academic Press, San Diego 1990.
- Planeta J., Karásek P., Vejrosta J.: *J. Sep. Sci.* 26, 525 (2003).
- Havliš J., Thomas H., Šebela M., Shevchenko A.: *Anal. Chem.* 75, 1300 (2003).
- Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.-L., Marvin-Guy L., Rami-Shojaei S., Brüßow H.: *J. Bacteriol.* 186, 7069 (2004).
- Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1979).

Z. Zdráhal^a, L. Eyer^b, H. Konečná^a, and J. Preisler^c (^aLaboratory of Functional Genomics and Proteomics, ^bDepartment of Genetics and Molecular Biology and ^cDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno): **Characterization of Bacteriophage 812 Proteome**

A lytic bacteriophage 812 ranks among promising candidates for phage therapy, which emerges as an alternative to antibiotics for treatment of staphylococcal infections. Proteome of bacteriophage 812 was analyzed using various mass spectrometry techniques. Eleven proteins were identified, of which seven for the first time. Gel electrophoresis with peptide mass fingerprinting was found the most efficient for overall analysis; HPLC-ESI MS was used for confirmation in dubious cases. Seemingly abnormal migration of main tail sheath protein (812_mtsp) was explained after adjustment of gel electrophoresis conditions and peptide mass fingerprinting combined with MALDI TOF/TOF MS results. Three similarly-sized 812_mtsp fragments, which originally migrated in one band, were separated and identified. Proteome characterization of bacteriophage 812 is a prerequisite for future comparison of the standard-type phage 812 with its mutants and related phages to correlate proteome changes with their different host range.