



國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

尿道致病性奇異變形桿菌中一毒素-抗毒素系統的毒素

蛋白 Hha 調控銅感受性及致病因子表現之研究

Hha, a toxin of bacterial Toxin-Antitoxin system, regulates
copper susceptibility and virulence factor expression in
uropathogenic *Proteus mirabilis*

趙月蓉

Yueh-Jung Chao

指導教授：廖淑貞 教授

Advisor: Shwu-Jen Liaw, Ph.D.

中華民國 一 一 二 年 七 月

July, 2023

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

尿道致病性奇異變形桿菌中一毒素-抗毒素系統的毒素蛋白

Hha 調控銅感受性及致病因子表現之研究

Hha, a toxin of bacterial Toxin-Antitoxin system, regulates
copper susceptibility and virulence factor expression in

uropathogenic *Proteus mirabilis*

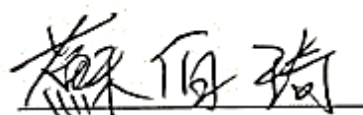
本論文係 趙月蓉 君（學號 R10424015）在國立臺灣大學醫學檢驗暨生物技術學系研究所完成之碩士學位論文，於民國 112 年 7 月 25 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

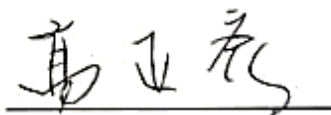
口試委員：



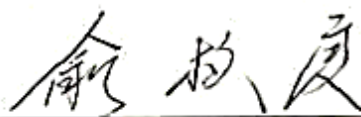
(簽名)

(指導教授)





系主任、所長



(簽名)

誌謝

時光飛逝，轉眼兩年過去。兩年時光轉瞬即逝，過程卻很漫長，這期間學習了許多實驗技術與新知，扎實的訓練與各方幫助讓我順利完成這本論文。從原本的 R442 實驗室搬遷到新建立的 R438 的過程是件不容易的事，R442 充滿了過去與學長姊們共處的回憶，而 R438 則是與學弟妹辛苦所建立的一點一滴，確實難以忘懷。新冠疫情雖然來勢洶洶，但仍堅持這兩年的學習讓我獲益良多，也認識了互相扶持的朋友，還好有這些朋友的陪伴與支持，即使每天待在水深火熱的環境中，忙裡偷閒的時間也樂得自在。

首先感謝廖淑貞老師一直都在辛苦的提供的各種實驗上的建議與協助，包容我粗心大意的缺點，在此謹向廖老師致以衷心的感謝！還有感謝賴信志老師、林稚容老師、楊翠青老師、蘇伯琦老師和高正彥老師四位口委老師給予的用心建議實在不勝感激。在此特別感謝文淵學長的用心教導，在我初來乍到時教導實驗基本功，告訴我其中的原理及注意事項。即使學長您博士班畢業離校後，仍能實驗方法出現問題時亦幫我想辦法解決問題，學長作為良師益友支撐著我實在感激不盡。謝謝王璐學姊跟玕婷學姊，妳們是我遇到過最親切最熱心的學姊。謝謝昱璇學姊在過去一年裡提供我實驗技巧上的指導。接下來也要特別感謝穎倫學姊，感謝你陪伴我到畢業的前一刻，謝謝你在實驗上給予我的幫助與鼓勵，也讓各種庶務得以分擔。謝謝庭振維持環境整潔，同時也為我讀研生活增添色彩。謝謝宥蓉學妹、佳偉學弟，謝謝你們在我碩一後半段幫助處理實驗室的雜事。

最後也是最重要的，我的好幾座靠山。我很感謝我的父母一直在背後無條件的支持著我並為我提供衣食無憂的生活環境，讓我能夠安心讀書學習，同時也感謝他們日常對我的關心與理解，讓我能夠放平心態看待問題。也謝謝我的妹妹們每天聽我的日常分享，接住我亂七八糟的話題與情緒。

碩士兩年可以認識到你們我覺得很高興也很幸運，感謝大家這兩年來給予我的關心及鼓勵，最後祝大家平安喜樂，萬事勝意！

中文摘要

奇異變形桿菌(*P. mirabilis*)是一種重要的泌尿道病原體，主要是經由尿道或導尿管進入泌尿道，爬行進入膀胱並增生，接著再沿著輸尿管上行至腎臟，造成腎臟感染。而銅是所有生命皆必需的微量元素，但過量也會對生物體造成毒性。細菌引起的泌尿道感染(urinary tract infection, UTI)會讓尿液中銅離子的濃度顯著上升，包括以 *P. mirabilis* 引發的 UTI。銅在巨噬細胞亦會發揮殺菌作用。

爲了探究 *P. mirabilis* 銅感受性的機制，本篇論文首先利用跳躍子突變法(transposon mutagenesis)的方式，篩選出對 3.25 mM 銅濃度感受性增加的 *P. mirabilis* 突變株(Cu-susceptible 突變株)，經過基因分析後得到 *hha* 突變株。本篇研究之 Hha 蛋白在 *Escherichia coli* 及 *Salmonella* 中作為毒素，與 antitoxin TomB 構成 Toxin-Antitoxin 系統。在 *E. coli* 及 *Salmonella* 中有研究表明，Hha 控制致病因子基因的表達。我們的研究結果表明，Hha 過表達對 *P. mirabilis* 菌體有毒性，TomB 的表達則可保護菌體。*hha* 缺失會影響細胞對銅的感受性，並改變致病因子，包括運動性、生物膜形成，以及在壓力環境下的存活，例如抗生素下 persistent cells 形成。蠟蛾體內毒力試驗顯示 *hha* 缺失使毒力下降。同時我們發現 *hha* 對致病因子的表達有 dose effect 的現象。Hha 透過正調控 *flhDC* 促進鞭毛蛋白生成，讓細菌具備較好的運動性。檢測纖毛相關基因顯示 Hha 和 *pmpA* 以及 *mrp* 表現呈正相關，而由細胞貼附試驗結果也發現 *hha* 突變株貼附尿上皮細胞能力較野生株下降。由抗壓相關表現型可觀察到 *hha* 突變株於酸性環境中與巨噬細胞試驗之生存率及 persister cell 的形成能力較野生株下降，同時觀察到 *hha* 突變株會使 *spoT*、*relA* 及 *rpoS* 等壓力相關基因表現減少。接著觀察到 *hha* 突變株較易促使細胞激素分泌。其後探討了 *hha* 突變株的基因調控，*tomB-hha* operon 具 autoregulation，*hha* 缺失引起調控外膜壓力的 *rpoE*、*rcsB* 及 *cueR* 表現量下降。在缺失 *cueR* 及 *cpxR* 的情況下，*hha* 表現量則下降，表明 *cueR* 及 *cpxR* 參與 Hha 的調控路徑。最後我們發現銅會誘導 *hha* 表現。由上述可得知，*hha* 於 *P.*

mirabilis 致病力及抗銅中扮演著重要的角色。

這是首次發現 TA 系統 toxin 參與尿道致病菌 *P. mirabilis* 致病因子表現的研究。



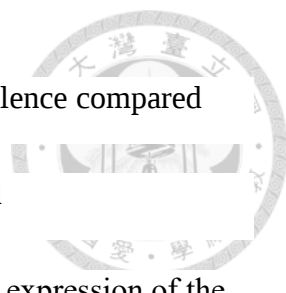
關鍵詞: 奇異變形桿菌、*hha*、銅、TA 系統、壓力抵抗、致病因子

英文摘要



Proteus mirabilis, a Gram-negative bacterium, is an important urinary tract pathogen in human, often causing urinary tract infections (UTI). Copper is a member of host innate immune system. When a urinary tract infection occurs, the copper concentration of human urine will increase, together with the copper increase in macrophages, to protect from the invading pathogens. Because the accumulation of excessive copper causes damages to the bacterial cells, the bacteria evolve a series of anti-copper mechanisms to maintain the copper homeostasis.

To investigate copper resistance mechanisms in *P. mirabilis*, we isolated copper-sensitive mutants by transposon mutagenesis. One of the mutant was found to be disrupted in the *hha* gene. Hha and TomB constitute a toxin-antitoxin system (TA) in *Escherichia coli* and *Salmonella* in which the antitoxin TomB is an enzyme which modifies the Hha toxin directly. Studies performed in *E. coli* and *Salmonella* also highlight the contribution of Hha in regulating bacterial virulence. Therefore, we investigated the role of Hha in virulence factor expression and found that *hha* mutant had a significant decrease in swimming, swarming and biofilm-forming ability. The *hha* mutant also exhibited a higher copper susceptibility than the wild-type strain with a dose-effect. It means that only within an optimal concentration range of Hha could restore the mutant phenotype to the wild type strain. The virulence test



of *Galleria mellonella* showed that the loss of *hha* decreased the virulence compared with wild-type and complemented strain. The reporter assay revealed that Hha positively regulated *flhDC* promoter activity. Moreover, the expression of the infectivity-related fimbrial genes, *mrpA* and *pmpA*, in *hha* mutant was significantly decreased. The *hha* mutant had lower *spoT*, *relA* and *rpoS* (genes involved in coping with stress environment) expression by the reporter assay. Accordingly, we observed that *hha* mutant had a lower survival rate on exposure to low pH or in macrophages and a lower ability to form persistent cells than the wild-type. The *hha* mutant exhibited lower adhesion ability and induced higher cytokine production than the wild-type strain. The expression of *rpoE*, *rcsB* and *cueR* was reduced in *hha* mutant, which suggests *hha* may participate in the *rpoE*, *rcsB* and *cueR* regulated pathways. We identified that copper or urea (high osmolarity) acts as a signal for induction of Hha expression, indicating the triggering of Hha-transduction pathway. In conclusion, Hha plays an important role in copper susceptibility and pathogenicity of *P. mirabilis*. This is the first study of investigating the TA system in *P. mirabilis*.

Keywords: *Proteus mirabilis*, *hha*, copper, TA system, stress resistance, virulence factors

目錄



口試委員會審定書.....	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
目錄.....	vii
圖目錄.....	ix
表目錄.....	xii
第一章 緒論.....	1
第一節 奇異變形桿菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)的基本介紹.....	1
第二節 <i>P. mirabilis</i> 的致病因子.....	1
第三節 銅之生物特性.....	3
第四節 Hha-TomB TA system 之簡介.....	4
第五節 Hha 之基本特性.....	5
第六節 研究動機與目的.....	6
第二章 實驗設計、材料與方法.....	7
第一節 實驗設計.....	7
第二節 實驗材料.....	8
第三節 構建突變株、互補株及過度表達株.....	11
第四節 突變基因之鑑定.....	20
第五節 表現型(phenotype)及毒力因子(virulence factors)分析.....	25
第六節 基因表達.....	38
第三章 實驗結果.....	45
第一節 篩選對銅高感受性之突變株.....	45

第二節 Hha-TomB Toxin-Antitoxin System 對生長的影響.....	46
第三節 突變株對銅之感受性.....	47
第四節 <i>hha</i> 突變株之表現型分析.....	48
第五節 Hha 與 TomB 之交互作用.....	55
第六節 <i>hha</i> 之表現型相關基因調控機制.....	56
第四章 結論與討論.....	61
第一節 結論.....	61
第二節 討論.....	63
第五章 圖.....	67
第六章 表.....	94
附錄.....	100
參考文獻.....	110

圖目錄



圖一、突變株之 Kanamycin cassette 插入突變處示意圖.....	67
圖二、確認突變株之 genomic DNA 上僅插入一個 Km1 cassette.....	67
圖三、比對 <i>P. mirabilis</i> 及 <i>E. coli</i> K12 和 <i>S. Typhimurium</i> 中 Hha 之胺基酸序 列.....	68
圖四、證明 <i>hha</i> 及 <i>tomB</i> 為同一 operon	68
圖五、Hha-TomB Toxin-Antitoxin System 對生長的影响.....	69
圖六、 <i>hha</i> 突變不影響 <i>P. mirabilis</i> 生長.....	70
圖七、 <i>hha</i> 突變株對銅之感受性.....	70
圖八、 <i>hha</i> 突變株、 <i>hha</i> 單獨過表達株及 <i>tomB</i> 的共表達株對銅之感受 性.....	72
圖九、 <i>hha</i> 突變株之 <i>rpoE</i> 、 <i>rscB</i> 、 <i>cueR</i> promoter 活性較野生株顯著下 降.....	73
圖十、 <i>hha</i> 突變株之泳動能力(swimming)較野生株顯著下降.....	73
圖十一、 <i>hha</i> 突變株鞭毛量顯著低於野生株.....	74
圖十二、 <i>hha</i> 突變株之表面移行能力(swarming)較野生株顯著下降.....	75
圖十三、 <i>hha</i> 突變株之菌體較野生株短小.....	75
圖十四、 <i>hha</i> 突變株之 <i>flhDC</i> promoter 活性較野生株顯著下降.....	76
圖十五、 <i>hha</i> 突變株之生物膜生成能力顯著下降.....	76
圖十六、 <i>hha</i> 突變株之 eDNA 生成量顯著下降.....	77
圖十七、 <i>hha</i> 突變株之 <i>pmpA</i> promoter 活性較野生株顯著下降.....	78
圖十八、 <i>hha</i> 突變株之 <i>mrp</i> 表現量較野生株顯著下降.....	79
圖十九、 <i>hha</i> 突變株之尿素酶活性較野生株顯著下降.....	79
圖二十、 <i>hha</i> 突變株和野生株的細胞黏附能力及入侵能力.....	80



圖二十一、 <i>hha</i> 突變株影響促發炎細胞素的表現量.....	81
圖二十二、 <i>hha</i> 突變影響細菌抗酸能力.....	81
圖二十三、 <i>hha</i> 突變株和野生株的巨噬細胞內存活能力.....	82
圖二十四、 <i>hha</i> 突變株之 persister cell formation 能力較野生株顯著下降.....	83
圖二十五、 <i>P. mirabilis</i> 之運動性受 Hha dose-effect 的影響.....	83
圖二十六、 <i>P. mirabilis</i> 之生物膜形成能力受 Hha dose-effect 的影響.....	84
圖二十七、 <i>P. mirabilis</i> 之抗酸能力受 Hha dose-effect 的影響.....	85
圖二十八、arabinose(0.1~0.5%)不影響帶 vector control 的 <i>hha</i> 突變株的生長.....	85
圖二十九、野生株、突變株與過度表現株於 <i>Galleria mellonella</i> 幼蟲的毒力.....	86
圖三十、表現 <i>tomB</i> 恢復 <i>hha</i> 的過表達導致生長情況較差與 conserved 的 cysteine C13 有關.....	87
圖三十一、表現 <i>tomB</i> 恢復 <i>hha</i> 的過表達導致泳動能力(swimming)較差與 conserved 的 C13 有關.....	87
圖三十二、表現 <i>tomB</i> 復 <i>hha</i> 的過表達導致生物膜形成能力較差與 conserved 的 C13 有關.....	88
圖三十三、Hha-TomB 之 auto-regulation.....	89
圖三十四、 <i>hha</i> 突變株之 <i>spoT</i> 、 <i>relA</i> 與 <i>rpoS</i> promoter 活性較野生株顯著下降.....	89
圖三十五、CueR 調控 <i>hha</i> 之基因表現.....	90
圖三十六、以 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)探究 CueR 與 <i>hha</i> 之關係.....	90
圖三十七、通過 CpxR 正向調控 <i>hha</i> 之基因表現量.....	91

圖三十八、*hha* 突變株及野生株的膜蛋白分析..... 92

圖三十九、銅或尿素（高滲透壓）會誘導 *hha* 表現.....92



表目錄



表一、 <i>hha</i> 突變株在高銅濃度環境下菌體內堆積銅離子較野生株高.....	94
表二、實驗中所使用的菌株及質體.....	94
表三、實驗中所用的引子.....	95
表四、 <i>hha</i> 突變株的表現型分析整理.....	99

第一章 緒論



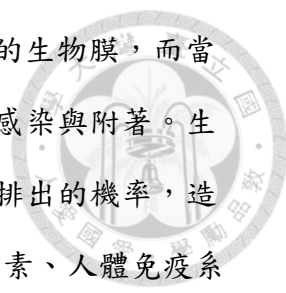
第一節 奇異變形桿菌 (*Proteus mirabilis*) 的基本介紹

奇異變形桿菌(*P. mirabilis*)為革蘭氏陰性兼性厭氧菌，是腸道桿菌科(*Enterobacteriaceae*)中變形桿菌屬(*Proteus*)，具周鞭毛，可以於 1.5%的 swarm plate 上形成牛眼狀之遊走現象(bull-eye shaped swarming)[1, 2]。 *P. mirabilis* 可從糞便、土壤及汙染的水源中被分離出來，在一般培養基中培養[3]。 *P. mirabilis* 為健康人類腸道的正常菌叢，但若出現在腸道之外的地方，或於免疫低下的患者，則容易造成伺機性感染(opportunistic infection)，進而導致敗血症、腎臟病、兒童腦膜炎、肺炎等，而最常見的為泌尿道感染(urinary tract infection, UTI)，若為嚴重感染症則可能引起結石而阻塞尿道。此外， *P. mirabilis* 易在導尿管上形成生物膜(biofilm)，增加長期使用尿管的病人之感染風險，而造成院內感染(nosocomial infection)[1]。

第二節 *P. mirabilis* 的致病因子

P. mirabilis 可以經由腸道或尿道進入泌尿系統[2]，如果是長期使用尿管的病人，細菌則有機會直接從導尿管進入泌尿道，爬行到膀胱，順著輸尿管上行感染腎臟，造成腎盂腎炎等嚴重的腎臟疾病[3]。在感染的過程中(附錄三)， *P. mirabilis* 需要許多毒性因子的參與，其中以鞭毛(flagella)、纖毛(fimbriae)、溶血酶(hemolysin)、尿素酶(urease)、生物膜(biofilm)、IgA 蛋白酶、胺基酸分解酶(deaminase) 和變形桿菌毒性凝集素(*Proteus* toxic agglutinin, Pta)等毒性因子較為重要(附錄一)[1, 2]。首先， *P. mirabilis* 的菌體具有周鞭毛，當接觸固體表面作為訊號後，會從單細胞短桿狀的 swimmer cell 分化成長型且多細胞(multicellular)多鞭毛(hyperflagellated)的 swarmer cell，此時會大量表現鞭毛，讓細菌具有表面移行能力[2]，這些長細胞會聚集在一起從而形成竹筏狀

(multicellular raft)以進行群體移動，以幫助 *P. mirabilis* 移行至各處進行感染，像是在泌尿道感染後若無盡早治療則可能造成細菌上行感染至腎臟，引發更嚴重之病症(附錄二)。當細菌在固體培養基上變成 swarmer cell，並向外爬行一段時間後，又會變回 swimmer cell 並停止爬行，此時即為 consolidation，此為 *P. mirabilis* 的週期性運動(附錄三)，而此時在固態培養基上即會呈現出 *P. mirabilis* 特有的同心圓狀移行紋路[3]。其它具有表面移行能力的細菌多無此週期性運動，因此也不會有同心圓紋路[4]。固體培養基中所含瓊脂 (agar) 的百分比是細菌能否進行表面移行的重要條件之一，大部分具表面移行能力的細菌是在 medium agar (0.4~1.2%)表面移行，例如:*Escherichia coli* 和 *Salmonella*，而 *P. mirabilis* 可在較高比例的 agar (1.5%) 表面進行移行[1, 4]。與表面移行相關的基因非常多，其中大部分為鞭毛合成的相關基因，如 class I *flhDC* operon、class II *fliA* 及 class III *flaA* 等。*flhDC* operon 能夠轉譯出 FlhD2C2 transcriptional activator，來調控下游多種蛋白質的合成(附錄四)，包含 class II 及 class III 鞭毛相關蛋白質，進而影響最終鞭毛形成的質與量，其中 Class II 的基因與鞭毛的 hook-basal body 合成有關，可連接鞭毛與細胞膜;class III 則與鞭毛的延伸的合成有關[2, 5]。*P. mirabilis* 於泌尿道之感染會受到尿液流動的影響，為對抗此沖刷力，細菌會產生許多纖毛及黏附因子來幫助附著於宿主黏膜表面，穩固菌體進行後續的感染[3]。其次，*P. mirabilis* 的纖毛種類非常多，像是 MR/K (mannose-resistant Klebsiella-like fimbriae) 及 MR/P (mannose-resistant Proteus-like fimbriae)，其中，MR/P 跟膀胱與腎臟細胞的感染有關[1, 3]，另外，P-like fimbriae 的表現較高時可以幫助細菌貼附於腎臟細胞，進而造成感染[6]，並促進尿管上生物膜的形成，同時也是 *P. mirabilis* 在感染泌尿道中必要的纖毛之一[2]。另外，溶血酶會造成真核細胞的細胞膜穿孔，讓細胞的滲透壓失衡，進而導致細胞破損傷亡。根據先前研究報導，溶血酶可以幫助 *P. mirabilis* 在腎臟中擴散及造成腎盂腎炎[7]。再者，存在於液體中自由游動的菌



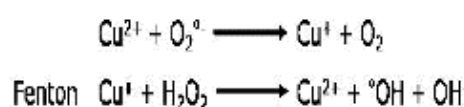
體 (planktonic cells) 在接收到環境中的訊號後會形成一個完整的生物膜，而當菌體量多到生物膜無法支撐時，細菌破膜而出，進行下一波的感染與附著。生物膜常見於尿導管上，一旦形成便能有效減少細菌受尿液沖刷排出的機率，造成患者反覆的感染。生物膜能隔絕外在的有害物質，例如:抗生素、人體免疫系統，造成治療上的困難[2, 8, 9]。在接受外在環境其他訊號刺激時，生物膜也有可能崩解，再度釋出成自由游動的個體。目前生物膜的組成仍未完全了解，一般認為是細菌多細胞行為，為抵禦環境而群聚的現象。在一些病人中也發現，如果 *P. mirabilis* 在導尿管上形成生物膜後，便具有顯著的感染能力，進而造成嚴重的院內感染，影響生物膜形成之因子包括胞外聚合物 (extracellular polymeric substances, EPS) 與 Extracellular DNA(eDNA)。eDNA 會形成穩定的絲狀結構[10]，有助細胞的聚集跟促進細胞間的黏附[11]，有報導指出 eDNA 與 EPS 的相互作用有助細菌於不利環境存活，提高對環境壓力的抵抗力[12]。另外細菌之 autoaggregation 能力是形成生物膜的第一步[13]。因此，生物膜的形成從而抵禦外在環境的壓力，有利細菌於宿主體內存活。另外，尿素酶會分解尿液中的尿素，產生氨(NH₃)及二氧化碳(CO₂)，使尿液之 pH 值升高，造成其中的陽離子如 Ca²⁺、Mg²⁺沉澱，最後形成尿道結石、膀胱結石，甚至腎結石。而形成的結石若體積較大則可能造成泌尿道阻塞，使尿液滯留，並且造成更多併發症感染[1-3]。而且，*P. mirabilis* 也可依附尿結石形成生物膜，藉此躲避抗生素及宿主免疫系統的攻擊[2, 3]。

第三節 銅之生物特性

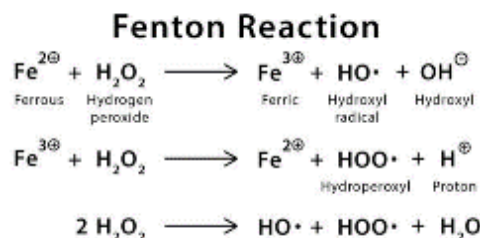
過渡金屬銅是生物體所必須的一種微量元素[14]，在生物體內主要以兩種形式存在，一種是還原態 Cu⁺，一種是氧化態的銅 Cu²⁺。生物體需要銅離子參與電子轉移，氧氣運輸及多種底物的氧化還原反應[15]。於人體及菌體中，銅離子均可作為細胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase)及銅/鋅超氧化歧化酶

(Cu/Zn-SOD)的輔助因子以幫助呼吸鏈電子傳遞的正常運行及幫助生物體抵抗超氧化物之傷害[16]。

然而高濃度的銅會對生物體造成傷害，例如人體暴露於高銅濃度的環境中會誘發印度兒童肝硬化(Indian childhood cirrhosis)[17];於細菌而言高濃度銅亦會對菌體造成傷害，有一個長期存在的假說指出二價銅離子可以與超氧陰離子反應產生一價銅和氧氣，該一價銅離子產物又可以與內源性 H_2O_2 發生 Fenton like reaction，並產生出羥基自由基(hydroxy redical)。過程如下所示[18]:



該過程中所產生的羥基自由基可以誘發細菌 DNA 的突變或是造成一些致命性破壞[19]，同時銅離子可通過與游離的硫醇基(thiol groups)進行結合或是將 Fe-S cluster 中的鐵置換出來，從而破壞蛋白質之結構及功能。而被置換出來的鐵離子又可以和 H_2O_2 發生 Fenton reaction，具體反應如下所示:



該反應過程中亦產生會對 DNA 造成損傷的自由基，由此可知銅離子可經由不同的形式來損傷細菌。因此早在西元前 2400 年人類就已經開始利用硫酸銅來消毒水和治療傷口[19]，而如今公共醫療場所中亦使用可降低細菌存活時間的銅製公共設施，來降低院內感染發生的機會。

第四節 Hha-TomB TA system 之簡介

大多數細菌基因組編碼多個自我調控的“毒素-抗毒素”基因對，稱為毒素-抗毒素系統 (Toxin-Antitoxin systems, TAs)。它們編碼抑制新陳代謝的“毒素”和

抑制毒素蛋白活性的“抗毒素”[20]。TA system 由相鄰的 toxin 毒素和 antitoxin 抗毒素基因組成。毒素具有多種細胞功能，例如抑制蛋白質合成、DNA 複製和細胞壁合成以響應不利的生長條件。抗毒素的表達可以中和毒素的毒力[21]。其中，*E. coli* 中的 *mqsRA* 系統可以調節多種生物過程，例如生物膜形成和抗氧化反應，通過抗毒素 MqsA 調節 *csgD* 或 *rpoS* 等調節因子的表達[22-24]。另外，*dinJ-yafQ* 基因對是一種獨特的 TA system，在生物膜形成時參與細胞死亡過程[25]。在 Hha-TomB TA system 中，*hha* 為 toxin，*tomB* 為 antitoxin。Hha-TomB TA system 在 *Escherichia coli* 及 *Yersinia enterocolitica* 中被發現為第一個 TA 系統，其中 antitoxin 是一種直接修飾 toxin 蛋白的 enzyme。於是被定義為第 VII 型 TA 系統。在第 VII 型 TA 系統中，antitoxin 通過轉譯後化學修飾毒素來中和 toxin 蛋白。Hha-TomB TA system 中的 antitoxin TomB 與 toxin Hha 瞬時相互作用形成複合物並通過 Hha 的氧化使 Hha 的 Cys18 失活；這種氧化破壞了 Hha 的穩定性[26]。根據文獻報導，Hha-TomB TA system 也是影響細菌感染力的重要角色[23, 27, 28]。另外有文獻報導，Hha 通過與細菌細胞中 *flhDC* 和 *csgDEFG* 啟動子區域的直接相互作用來調節 *flhD* 和 *csgD* 表達，進而來調節 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 中生物膜的形成[29]。此外，毒素 Hha 會增加 persister cell 的形成[30]。另一方面，TA system 具自我調控機制。抗毒素通常會結合至啟動子以抑制 TA system 的轉錄，在大多數描述的情況下具有低親和力。通過與其同源毒素形成複合物可以增強這種親和力。超過一定的毒素/抗毒素比例將導致無法與其操縱子結合[22]。

第五節 Hha 之基本特性

Hha 最先在 *E. coli* 中被發現為調節 haemolysin (*hly*) 基因的表達一種能夠增加細胞中的溶血素 (haemolysin) 表達[31, 32]。在 *E. coli* 中有研究表明，Hha 控制其他毒力因子基因的表達[33]。根據文獻報導，於 *E. coli* 中 Hha 是透過

FlhDC 調節運動性。而 *hha* 基因剔除，其生物膜形成能力相較於野生株皆變差 [29]。



第六節 研究動機與目的

革蘭氏陰性的奇異變形桿菌(*P. mirabilis*)是人體一種重要的臨床常見尿道致病菌，常與長期植入尿導管相關的尿道感染有關。當尿道感染 *P. mirabilis* 時，人體會提升尿液中的銅濃度以抵禦細菌的入侵，其中以 *P. mirabilis* 引發的尿道感染可使尿液中銅濃度上升，而當尿道感染發生時人體亦會啟動免疫反應，當巨噬細胞吞噬外來致病菌後，其 phagosome 中的濃度亦可上升至約 500 μM 。然而過量的銅會對菌體造成傷害，所以細菌會啟動抗銅機制來維持菌體內銅濃度的恆定，目前對於 *E. coli*、*Acinetobacter baumannii*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Salmonella* strains 等細菌的抗銅機制已有了較為廣泛的瞭解，但對 *P. mirabilis* 的抗銅機制所知甚少，故本篇欲利用跳躍子卡匣突變法構建突變菌株，並以高濃度銅來挑選出對銅感受性高之突變株，希望可以以此分析出 *P. mirabilis* 之抗銅機制。而目前分析出的 Hha 為 Hha-TomB TA system 中的 toxin。這是首次發現 TA toxin 系統參與尿道致病菌 *P. mirabilis* 致病因子表現的研究。根據 Transcriptome 的分析結果可知 *P. mirabilis* N₂ 中只有 single-copy 的 *tomB* 及 *hha*。故本篇研究欲探討 Hha 於 *P. mirabilis* 中扮演之角色，以及是否影響其毒力，並找出其可能的基因調控機制。

第二章 實驗設計、材料與方法



第一節 實驗設計

利用跳躍子卡匣突變法構建突變菌株



篩選出對銅感受性提高之突變株



鑒定突變株之突變基因



分析 *hha* 突變株之表現型及毒力因子



建構相關基因之補償株和過度表現測試相關表現型及毒力因子並以 reporter
assay 、real time PCR 和 EMSA 來探討 *hha* 之基因調控機制

第二節 實驗材料

(一)實驗菌株、質體及引子:

實驗中所用之菌株及質體詳列於表二，實驗中所使用之引子序列詳列於表三。

(二)培養基、試劑、抗生素、儀器及網站:

【培養基】

1. Luria-Bertani broth (LB broth): 2 g LB powder (約含 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract 及 0.5 g NaCl) 加入 100 ml 二次水中後滅菌。
2. Luria-Bertani plate (LB plate): 2 g LB powder 以及 1.5 g agarA 加入 100 ml 二次水中，滅菌後混合均勻，待降溫後倒入培養皿中。
3. LSW plate: 含 1 g Tryptone, 0.5 g Yeast extract, 0.04 g NaCl, 0.5 ml glycerol 及 2 g agar, 加入 100 ml 二次水中，滅菌後混合均勻，待降溫後倒入培養皿中。
4. Mueller-Hinton broth: 2.1 g MH broth powder (約含 beef extract 0.2 g, acid digest of casein 1.75 g, starch 0.15 g) 加入 100 ml 二次水中後滅菌。
5. Glucose Minimal medium (GM medium): 由 0.8 mM MgSO_4 , 9.52 mM Citric acid, 57.4 mM K_2HPO_4 , 8.4 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.4% D-Glucose 組成。

【試劑組(kit)】

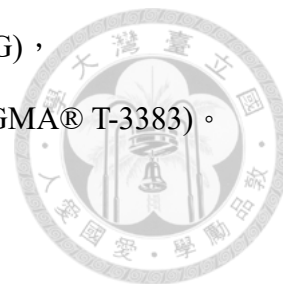
1. Gene-Spin™ MiniPrep Plasmid Purification Kit
2. Gene-Spin™ DNA Purification Kit
3. Promega pGEM®-T Easy Vector Systems
4. Invitrogen SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System

【抗生素】

Ampicillin (SIGMA® A-9518), Chloramphenicol (SIGMA® C-0378),



Gentamicin (SIGMA® A-9518) , Kanamycin (SIGMA® K4000-5G) , Streptomycin sulfate salt (SIGMA® S6501-25G) , Tetracyclin (SIGMA® T-3383) 。



【儀器】

1. 離心機: Biofuge fresco , KUBOTA 3700 , BECKMAN L8-M Ultracentrifuge
Biometra T3 Thermocycler
2. 分光光度計: Amersham GeneQuant pro , Pharmacia Biotech
Spectrophotometer , Molecular Devices SpectraMax M5 , VersaMax™ Tunable
Microplate Reader , Molecular Devices
3. 電穿孔儀: BIO-RAD Micropulser
4. 培養箱: COCONO Hybridization Incubator , KS DSI500 Orbital Shaking
Incubator
5. 酸鹼度測定計: JENCO 6173 pH meter
6. 聚合酶連鎖反應儀: Biometra T3000 thermocycler
7. 即時聚合酶鏈式反應儀: Real-time PCR:ABI PRISM 7500
8. 冷光影像擷取系統: ImageQuant™ LAS 4000

【網站】

1. National Center for Biotechnology Information(NCBI): 序列比對、參考資料查詢
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
2. OligoAnalyzer: 引子設計
<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>
3. EcoCyc: E. coli: 基因資料庫
<http://ecocyc.org/>

4. TMHMM Server v. 2.0: 蛋白質 transmembrane helices 預測

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>



第三節 構建突變株、互補株及過度表達株

【跳躍子卡匣子突變方法(transposon mutagenesis)】 [34]

實驗原理:

利用 mini-Tn5 mutagenesis 來構建突變株，因 mini-Tn5 會將 kanamycin 卡匣隨機插入 *P. mirabilis* N₂ wild type 的基因組中，故先用 Kanamycin 和 Tetracyclin 來篩選突變株，接著再從中挑選出對 Cu 抗性下降的突變株。

實驗材料:

10 mM MgSO₄，NC membrane，LSW plate

實驗方法:

1. 將 mini-Tn5 Km1 cassette 的 pUT 載體 (pUT-Km1)從含有 pUT-Km1 的 *E. coli* 中純化出來。
2. 利用電穿孔法將 pUT-Km1 載體送至 *E. coli* S17-1 勝任細胞中，並用含有 100 µg/ml Kanamycin 的 1.5 % LB plate 篩選菌落。
3. 挑選含 pUT-Km1 載體的 S17-1 和 *P. mirabilis* N₂ wild type 的單一菌落，分別置於 5 ml LB broth 中進行 37°C 隔夜培養。
4. 隔日取 1 ml S17-1 pUT-Km1 和 1 ml N₂ wild type 菌液，將其分別置於 eppendorf 中進行離心，去除上清液後用 1 ml 10 mM MgSO₄ 進行回溶，此後再用 10 mM MgSO₄ 對細菌進行清洗，最後分別用 100 µl 10 mM MgSO₄ 進行回溶。
5. 將清洗後的 100 µl S17-1 pUT-Km1 和 100 µl N₂ wild type 於微量離心管中進行混合。
6. 將 NC membrane 置於 LSW plate 上，並將混合後的菌液滴置 NC membrane 上，待液體完全被 LSW plate 吸收後，再將 plate 倒置於培養箱中 37°C 隔夜培養。
7. 翌日將 plate 上的 membrane 轉移至 5 ml 10 mM MgSO₄ 中，以 vortex 的形式



將 membrane 上的菌震蕩下來，之後從中取 500 μ l 菌液，將其濃縮為 150 μ l 的體積後均勻塗布于含 100 μ g/ml Kanamycin 和 12.5 μ g/ml tetracycline (TK) 的 LSW plate 上，進行 37°C 隔夜培養。

8. 次日將盤上生長的菌落分別點於 LSW plate 和 3.25 mM CuCl_2 的 LSW plate 上，兩個 plate 上分別用 wild type 和 *cpxR* mutant 作為陽性對照和陰性對照，之後將盤進行 37°C 隔夜培養。

9. 隔日挑選在 3.25 mM CuCl_2 的 LSW plate 上不長，但在 LSW plate 上生長的菌。

【基因體 DNA (genomic DNA) 萃取】

實驗材料:

Digestion buffer: 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2%

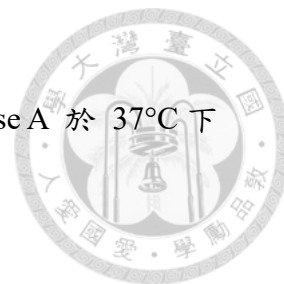
SDS

實驗方法:

1. 挑選單一菌落接種於 5 ml LB broth 中震盪培養隔夜。
2. 隔天取 3 ml 菌液以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後去除上清液，加入 500 μ l Digestion buffer 以微量吸管將細菌完全懸浮後，於 55°C 作用 1 小時。
3. 待菌液從混濁到澄清後，再加入 200 μ l 8 M 醋酸銨 (Ammonium acetate; NH_4OAc) 與 200 μ l 氯仿 (Chloroform) 劇烈震盪 (vortex) 混合至混合液呈現乳白色混濁。
4. 以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置於另一乾淨的微量離心管中。
5. 加入等體積冰異丙醇 (isopropanol)，輕輕地上下倒置均勻混合 25 次，靜置於室溫中 5 分鐘。
6. 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，小心除去上清液。
7. 加入 1000 μ l 冰的 70 % 酒精清洗 1 次。

8. 去除殘餘液後，將微量離心管置於抽氣櫃乾燥。

9. 加入 50 μ l 二次水於 55°C 下溶解 DNA，並加入 1 μ l RNase A 於 37°C 下作用 1 小時去除 RNA，即可存放於-20°C 冰箱中。



【構建過度表現(overexpression)株】

實驗方法:

構建目標基因於 pGEM-T Easy 載體(附錄五)

1. 設計一對引子(見表三)將待測基因全長(需保留基因本身的 RBS)進行 PCR 擴增，並跑膠以確認產物片段大小是否符合預期。
2. 將 PCR 產物進行純化，並用 TA cloning 將純化後之 PCR 產物轉型至勝任細胞(DH5 α)中。
3. 利用 T7 或 SP6 引子與目標基因的引子進行方向確認，挑出與 lac promoter 同方向的質體，再轉型至 wild type 中，並以 ampicillin 做篩選，此為過度表現株。

【構建互補菌株(complementation)】

實驗材料:

使用 Promega pGEM® -T and pGEM® -T Easy Vector Systems 進行選殖

pBAD33 作為補償的載體

實驗方法:

1. 設計 5'端帶有 *Kpn*I 切位之 forward primer 以及 5'端帶有 *Xba*I 切位之 reverse primer，將待測基因全長(需保留基因本身的 RBS)進行 PCR 擴增，並跑膠確認片段大小是否符合預期。
2. 將 PCR 產物進行純化。
3. 以 *Kpn*I 及 *Xba*I 作用於 PCR 產物(5 μ g) 與 pBAD33 vector (5 μ g)。

4. 將酵素作用後基因(insert)與 pBAD33 質體(vector)進行膠體純化，之後進行黏合反應並轉型入勝任細胞中，以 chloramphenicol 40 µg/ml 進行篩選，並用 PCR 確認含有正確質體的菌株。
5. 抽取大量地正確之質體以電穿孔方式送入 *P. mirabilis* 突變株中並以 chloramphenicol 作篩選以完成互補菌株建構。
6. 互補菌株培養時需外加 chloramphenicol 40 µg/ml 使質體持續表現。

【聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction , PCR)】

實驗材料:

proTaq (PROTECH), 10X Taq buffer, Primer, dNTP, Template DNA, ddH₂O

實驗方法:

1. 在 200 µl 微量離心管中混合下列試劑:

試劑	體積(µl)	體積(µl)
Template DNA	0.5	1
Primer mixture (5 µM)	1	2
dNTP (2.5 mM)	2	4
10X Taq buffer	2.5	5
Taq polymerase	0.3	0.6
ddH ₂ O	18.7	37.4
總體積	25	50

5 µM Primer mixture: forward and reverse primer mixture

2. 混合均勻後，將離心管放入 PCR 溫度控制器中，進行 PCR 反應，PCR program

設定如下:

95°C , 5 min

95°C , 30 s	30 cycles
X°C , 30 s (X 視 T _m 值)	
72°C , Y min (Y 視 PCR 產物大小)	
72°C , 10 min	



3.反應後的 PCR 產物以 1 % ~ 2%的瓊脂凝膠進行電泳，以確定 PCR 產物是否為預期的大小。

【TA 選殖】

實驗材料:

25% x-gal , 1 M IPTG , Promega pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

實驗方法:

1. 純化後的 DNA 與下列試劑混合於微量離心管中:

試劑	體積(μl)
PCR product	3
pGEM®-T Easy vector	1
2X Rapid Ligation Buffer	5
T4 DNA ligase	1
總體積	10

2. 均勻混合後，置於 16°C ligation 隔夜 (至少 16 小時)。

3. 從中取 5 μl 以熱處理的方式將其送入勝任細胞中，此後取菌液 200 μl 加入 20 μl 2% x-gal 和 10 μl 1 M IPTG 混合，並均勻塗抹至含抗生素 100 μg/ml ampicillin LB plate 進行篩選。

4. 隔夜培養後，從盤上挑取 4~6 株白色之單一菌落，抽取其質體並利用適當的限制酶確定其建構的情形。(藍色菌落表示質體上無欲接入的目標 DNA)



【質體 DNA (plasmid DNA) 萃取】

實驗材料:

Gene-Spin™ MiniPrep Plasmid Purification Kit

實驗方法:

1. 挑選單一菌落接種於 5 ml LB broth (含適當抗生素) 中，並於 37°C 震盪培養隔夜。
2. 以 13,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後，收集菌塊於微量離心管中。
3. 加入 200 μ l PD1 Buffer (含有 RNase A，儲存並 4°C) 將菌塊充分懸浮均質。
4. 加入 200 μ l PD2 Buffer，將微量離心管輕輕地上下倒置 5~10 次後靜置 5 分鐘，直到液體變澄清，即表示細菌完全溶解。
5. 加入 300 μ l PD3 Buffer 後立刻輕輕地上下倒置 10 次混合均勻後靜置 5 分鐘。
6. 以 13,000 rpm 離心 15 分鐘，取 PD Column 置於 Collection Tube 中，將離心後的上清液轉移至 PD Column 中。
7. 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，去除 Collection Tube 中的液體。
8. 加入 700 μ l Wash Buffer，13,000 rpm 離心 1 分鐘後，去除 Collection Tube 中的液體。
9. 重複上一個步驟
10. 以 13,000 rpm 離心 10 分鐘以去除多餘的 Wash Buffer。
11. 將 PD Column 放入新的微量離心管中，加入 32 μ l 55°C 無菌水，靜置 5 分鐘後以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，收集純化的 plasmid DNA，該 plasmid DNA 可保存於-20°C。

【構築定點突變株 (construction of site-direct mutagenesis strain)】



1. 以過度表現質體為模板，設計帶有突變位點之反向引子對進行反向聚合酶連鎖反應 (inverse PCR)。
2. PCR 產物利用 *DpnI* 以 25 : 1 的比例在 37°C 處理 1 小時。
3. 取 2 μ l *DpnI* 處理過的 PCR 產物、2 μ l 10X T4 DNA ligase buffer、1 μ l T4 DNA polynucleotide kinase、1 μ l T4 DNA ligase 以及 14 μ l ddH₂O 進行 ligation(16°C，16-18 小時)

【勝任細胞 (competent cell) 製備】

(一)電穿孔法 (electroporation)

實驗材料:

200 ml 新鮮 LB broth，350 ml 10% glycerol

實驗方法:

1. 挑選單一菌落接種於 5 ml LB broth 中，以 37°C 震盪培養隔夜。
2. 取 2 ml 隔夜菌液以 1:100 稀釋接種於 200 ml 新鮮 LB broth 中，以 37°C、200 rpm 震盪培養至 OD₆₀₀ 0.5~0.7 (約 3 小時)。
3. 將菌液置於冰上 30 分鐘，之後平均分裝至 4 管 50 ml 離心管中，以 6,500 rpm、4°C 離心 10 分鐘。
4. 去除上清液，加入少量冰的 10 % glycerol 將細菌懸浮，之後再補 10 % glycerol 至 40 ml。
5. 以 6,500 rpm、4°C 離心 10 分鐘，移除上清液後加入少量冰的 10 % glycerol 將細菌懸浮，並將四管合成兩管後再補 10 % glycerol 至 40 ml。
6. 以 6,500 rpm、4°C 離心 10 分鐘後去除上清液，加入少量冰的 10 % glycerol 將細菌懸浮，並將兩管合成一管後再加 10% glycerol 至 40 ml。
7. 以 6,500 rpm、4°C 離心 10 分鐘後倒去上清液，加入適量 10 % glycerol 將細

菌懸浮 (即勝任細胞)，之後分裝 100 μ l 於滅菌的微量離心管中，於-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。



(二) 熱處理法勝任細胞

實驗材料:

新鮮 LB broth，0.1 M $MgCl_2$ ，0.1 M $CaCl_2$ ，10% glycerol

實驗方法:

1. 挑選單一菌落接種在 5 ml LB broth 中於 37 $^{\circ}$ C 震盪培養隔夜。
2. 取隔夜培養菌液以 1:100 稀釋接種於 200 ml LB 中，於 37 $^{\circ}$ C 以 200 rpm 震盪培養 (約 2 小時)。
3. 將菌液置於冰上 30 分鐘後，分裝至 50 ml 離心管，以 4 $^{\circ}$ C、6,500 rpm 離心 10 分鐘。
4. 去除上清液後，加入 4 $^{\circ}$ C 含 0.05 M $CaCl_2$ 及 0.05 M $MgCl_2$ 之溶液懸浮菌塊，以 4 $^{\circ}$ C、6,500 rpm 離心 10 分鐘。
5. 去除上清液，加入 4 $^{\circ}$ C 0.1 M $CaCl_2$ 懸浮菌塊，以 4 $^{\circ}$ C、6,500 rpm 離心 10 分鐘。
6. 去除上清液，加入約 2 ml 4 $^{\circ}$ C 含有 10% glycerol 的 0.1 M $CaCl_2$ 懸浮菌塊，分裝 100 μ l 於微量離心管中，在-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

【轉型作用 (transformation)】

(一) 電穿孔法 (electroporation)

實驗材料:

Electroporation 勝任細胞，1 ml LB broth、electroporation cuvette

實驗方法:

1. 將 electroporation 勝任細胞從-80 $^{\circ}$ C 冰箱中取出，置於冰上解凍。
2. 以旋轉的方式緩慢加入 1~5 μ l DNA(pure plasmid: 1 μ l; ligation mixture:3-5 μ l)

於勝任細胞中，混合均勻後將其靜置於冰上 5 分鐘，此後再將其轉移至 electroporation cuvette 中並置於冰上。

3. 利用 BIO-RAD GenePulser 進行電擊 (選取 Ec 2 模式)，此後取 1 ml 冰的 LB broth 將 electroporation cuvette 中的菌液沖出並將菌液移至微量離心管中，以 37°C、200 rpm 震盪培養 1 小時。

4. 取適量菌液均勻塗在含有適當抗生素的培養基上，37°C 培養隔夜後挑選單一菌株進行分析。

(二) 熱處理法 (heat shock)

實驗材料:

heat shock 勝任細胞，1 ml LB broth

實驗方法:

1. 將 heat shock 勝任細胞從 -80°C 冰箱中取出，置於冰上解凍。
2. 以旋轉方式緩慢加入 5 μ l DNA 於勝任細胞中，靜置冰上 30 分鐘。
3. 將混合管以 42°C 水浴槽反應 120 秒後，迅速置於冰上 5 分鐘。
4. 取 1 ml 冰 LB broth 加入混合管中，以 37°C、200 rpm 震盪培養至少 1 小時。
5. 取適量菌液，將其均勻塗在含適當抗生素的培養基上，於 37°C 隔夜培養後，挑選單一菌落進行分析。

第四節 突變基因之鑑定

實驗目的:

利用 Nested PCR 和定序的方式來確認抗藥卡匣 kanamycin 插入 wild type 基因組的位置。

【Single Primer PCR】

實驗材料:

proTaq (PROTECH), dNTP, 10X Taq buffer

實驗方法:

1. 利用卡匣兩端已知序列向外設計一對引子 I-out、O-out 和 O-out 2.0, 以及隨機設計引子 R1 以及 R2。
2. 在 200 μ l 微量離心管中混合下列試劑:

試劑	體積 (μ l)
Template DNA	0.5
5 μ M Primer(o-out 2.0/R1)	0.5
dNTP (2.5 mM)	1
10X Taq buffer	1.25
Taq polymerase	0.125
ddH ₂ O	8.625
總體積	12.5

3. 混合均勻後, 將離心管放入 PCR 溫度控制器中, 進行 PCR 反應:

PCR program 設定如下:

95°C, 5 min	
95°C, 30 s	6 cycles
30°C, 30 s	



72°C ， 1 min	30 cycles	
95°C ， 30 s		
45°C ， 30 s		
72°C ， 2 min		
72°C ， 4 min		



4. 反應後的產物用 1 %~2%的瓊脂凝膠進行電泳，若電泳圖結果只顯示出數種長度的 DNA 片段，則取該 PCR 產物用引子 o-out/i-out 和 R2 再進行第二次 PCR 反應：

PCR program 設定如下：

95°C ， 1 min	
95°C ， 30 s	30 cycles
54°C ， 30 s	
72°C ， 2 min	
72°C ， 4 min	

5. 若電泳圖結果只顯示出一種長度的 DNA 片段，則取該 PCR 產物用引子 o-out/i-out 去定序。
6. 將定序結果與 NCBI 上發表的 *P. mirabilis* HI4320 序列進行比對，找出抗藥卡匣可能破壞的基因為何，再設計一對引物對該基因進行 PCR 和定序，以確認卡匣插入 wild type 基因組的確切位置。

【定序及比對鑑定基因】

使用網站及軟體：

Sanger's institute:<http://www.sanger.ac.uk/> CBI:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Lasergene 軟體

分析方法:

1. 用引子 o-out/i-out 對第二次 Nested PCR 產物進行定序。
2. 定序結果與 NCBI 網站上發布的 *P. mirabilis* HI4320 的序列做比對 (nucleotide BLAST), 找出卡匣可能破壞的基因為何。
3. 設計一對引物對該基因及抗藥卡匣進行 PCR 和定序, 以確認抗藥卡匣插入 wild type 基因組的確切位置。
4. 以 Lasergene 軟體之 SeqBuilder 繪出抗藥卡匣插入的確切位置。

【DNA 膠體純化 (gel purification)】

實驗材料:

Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit

實驗方法:

1. 將欲純化 DNA 從瓊脂凝膠上切下放入微量離心管中, 加入 500 μ l DF Buffer (視膠體積大小), 於 55~60°C 反應 10~15 分鐘至瓊脂凝膠完全溶化為止。
2. 將 DF Column 放入 Collection Tube 中並將上述混合物加入, 以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後, 倒除 Collection Tube 中的液體。
3. 加入 700 μ l Wash Buffer, 13,000 rpm 離心 1 分鐘, 再次移除 Collection Tube 中之液體。
4. 重複上一步驟。
5. 移除 Collection Tube 換上新的微量離心管, 加入適量 55°C 二次水在室溫下靜置 5 分鐘後, 以 13,000 rpm 離心 5 分鐘收集純化的 DNA。

【PCR 產物純化】

1. PCR 產物中加入 5 倍體積的 DF Buffer, 將其上下倒置混勻。



2. 將 DF Column 放入 Collection Tube 中並將上述混合物加入，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，倒除 Collection Tube 中的液體。
3. 加入 700 μ l Wash Buffer，13,000 rpm 離心 1 分鐘，再次移除 Collection Tube 中之液體。
4. 重複上一步驟。
5. 移除 Collection Tube 換上新的微量離心管，加入適量 55°C 二次水在室溫下靜置 5 分鐘後，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘收集純化的 DNA。

【DNA 黏合 (ligation)】

實驗材料:

NEW ENGLAND BioLabs®Inc. T4 DNA ligase

實驗方法:

1. 將載體 (vector) 與將要進行黏合的片段 (insert)及其他試劑以下列比例均勻混合:

試劑	體積(μ l)
vector DNA	1
Insert DNA	7
10X T4 ligation buffer	1
T4 DNA ligase	1
總體積	10

(進行 sticky end 的 DNA 黏合莫耳數比為 insert:vector = 3:1，而 blunt end 的 DNA 黏合莫耳數比則為 insert:vector = 6:1。)

3. 置於 16°C 反應隔夜 (至少 16 小時)。
4. 取 5 μ l 做細胞轉型至勝任細胞中，再取 4~6 株單一菌落，抽取質體利用適

當的限制酶作用後跑膠確定是否 ligation 成功而得到目標質體。



第五節 表現型(phenotypes)及毒力因子(virulence factors)分析

【生長曲線(growth curve)測定】

實驗材料:

LB broth, CM-600-AS1 colorimeter

實驗方法:

1. 挑選菌株單一菌落於 5 ml LB, 於 37°C 下 200 rpm 震盪培養隔夜。
2. 將菌液調整 OD₆₀₀ 為 0.01, 於 37°C 下 200 rpm 震盪培養。
3. 每小時取 1 ml 菌液測量 OD₆₀₀ 吸光值, 紀錄各時間點之 OD₆₀₀ 值, 並畫出生長曲線。

【菌體內銅濃度測定】

實驗材料:

LB (含不同銅濃度), PBS, 感應耦合電漿質譜儀 (ICP-MS)

實驗方法:

1. 將菌株種於 5 ml LB broth 中於 37°C 200 rpm 震盪培養隔夜至少 16 小時。
2. 分別以起始 OD₆₀₀=0.01 於 20 ml LB 及 2 mM Cu LB sub-culture 5 小時。
3. 以 5,250g 離心 10 分鐘後去上清液。
4. PBS wash 3 次, 並以 4 ml PBS 回溶。
5. 以 sonication 方式打 20 秒、停 10 秒、amp. 80%共打 8 (含銅)或 9 分鐘(不含銅)。
6. 破菌後以 5,250g 離心 30 分鐘, 收集上清液。
7. 取 1 ml 上清液, 並以感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)檢測其銅濃度。

【表面移行(swarming)能力測試】

實驗材料:



1.5 % Luria agar plate (培養基厚度亦會影響表面移行速度，因此每盤體積固定為 20 ml)

實驗方法:

1. 挑選菌株單一菌落於 5 ml LB，於 37°C 下 200 rpm 震盪培養隔夜。
2. 取隔夜菌液 5 μ l 滴於 1.5% Luria agar plate 中央，待菌液完全吸附後將 plate 置於 37°C 培養箱中，每小時紀錄最外圈與中央菌落之間的爬行距離(最外圈直徑-最內圈直徑)/2。

【泳動能力(swimming)測試】

實驗材料:

0.3% Luria agar plate

實驗方法:

1. 挑選菌株單一菌落於 5 ml LB，於 37°C 下 200 rpm 震盪培養隔夜。
2. 將接種針燒紅滅菌後，沾菌液插入 0.3% Luria agar plate 中央，置於 37°C 培養箱中 18 小時後，觀察細菌泳動之半徑。

【生物膜 (biofilm) 生成能力】 [35]

實驗材料:

0.1% 結晶紫染劑: 取 crystal violet powder (Sigma) 以 wt/vol 加無菌水配製至最終濃度 0.1%

Acetone : Ethanol = 1 : 4 脫色液: 取 Acetone 和 Ethanol 以 vol/vol 1 : 4 比例配製之混合液

實驗方法:

1. 取隔夜培養的菌液 2 μ l 加至 96 孔盤內 198 μ l 的 LB broth 中 (quadruplication)，一組只有 LB broth 當做 blank，於 37°C 靜置培養 16 小

時。

2. 測量隔夜菌液的菌量 OD₆₀₀ 數值。
3. 將菌液完全吸乾後，以 200 µl 無菌水清洗 2 次。
4. 加入 200 µl 0.1% 結晶紫染劑，染 10 分鐘，吸除結晶紫染劑。
5. 以 200 µl 無菌水清洗 3 次，置於 37°C 烘箱風乾殘餘液體。
6. 加入 200 µl Acetone : Ethanol = 1 : 4 之混合液，放置 10 分鐘至染色後生物膜溶解，測量並記錄 OD₅₇₀ 數值。
7. 計算 OD₅₇₀/OD₆₀₀ 比值。



【eDNA 定量試驗】 [36]

實驗材料:

LB broth, NaCl, 0.45 µm filter, 酒精, ddH₂O

實驗方法:

1. 挑選菌株單一菌落於 5 ml LB，於 37°C 200 rpm 震盪培養 16 小時。
2. 將細菌 1:100 稀釋於 LB broth，於 37°C 靜置培養 16 小時。
3. 取 500 µl 菌液，以 13,000 rpm 離心 3 分鐘，以 0.45 µm filter 過濾上清液，添加 NaCl 至濃度 0.25 M 並添加 1 ml 95%酒精。
4. 以 13,000 rpm 離心 3 分鐘之後，倒掉上清液，風乾之後再加 ddH₂O 回溶。
5. 以 OD₂₆₀ 偵測 eDNA 含量。

【尿素酶活性測驗】

實驗材料:

0.5 M Urea in LB broth, 100 mM Sodium Hypochlorite with 0.28 M NaOH, 2%

Phenol in 75% EtOH

實驗方法:

- 
1. 挑選菌株單一菌落於 5 ml LB，於 37°C 下 200 rpm 震盪培養隔夜。
 2. 1:100 次培養於 5 ml LB broth，以 37°C 培養 5 小時。
 3. 將菌液調成 $OD_{600} = 1$ 後，把培養液置換成 0.5 ml 0.5 M urea LB broth，於 37°C 下靜置培養 2 小時。
 4. 混和均勻後，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，取 100 μ l 上清液至 96 well 盤。
 5. 加入 100 μ l 100 mM Sodium Hypochlorite with 0.28 M NaOH 混和均勻，再加入 100 μ l Phenol in 75% EtOH，混合均勻後置於 55°C 反應呈色 10 分鐘。
 6. 測量 OD_{625} 之吸光值。
 7. 將各菌株之吸光值減去無菌 negative control 吸光值，比較各菌株產生之 NH_4 濃度。

【酸性壓力抵抗能力測試 (Acid resistant)】 [37]

實驗材料:

LB broth，pH = 3 LB broth，LSW plate

實驗方法:

1. 將菌株接種於 5 ml LB broth 中，以 37°C、200 rpm 震盪培養 16~18 小時。
2. 將菌液以 1:100 接種於 LB，培養 4 小時。
3. 各取 1 ml 菌液離心後吸出上清液，分別加入 1 ml LB broth 及 1 ml pH3 LB broth。
4. 靜置培養 2 小時後取出菌液以 8,000 rpm 離心 2 分鐘收集菌塊。
5. 以 1 ml PBS wash 2 次，以 8,000 rpm 離心 2 分鐘。
6. 序列稀釋 $10^0 \sim 10^6$ 點盤至 LSW plate (triplication)。
7. 培養隔日後，計算 colony forming unit (CFU)，並將處理酸組別的 CFU 除以不處理組別的 CFU，算出存活率(survival rate)。

【Persister cell formation assay】 [37]

實驗材料:

LB broth, LSW plate

實驗方法:

1. 將菌株接種於 5 ml LB broth 中，以 37°C、200 rpm 震盪培養 16~18 小時。
2. 將菌液以 1:100 接種於 LB，培養 4 小時。
3. 各取 1 ml 菌液離心後吸出上清液，分別加入 1 ml LB broth 及含抗生素 50 µg/ml ampicillin LB broth。
4. 靜置培養 2 小時後取出菌液。
5. 序列稀釋 $10^0 \sim 10^6$ 點盤至 LSW plate (triplication)。
6. 培養隔日後，計算 CFU，並將處理抗生素組別的 CFU 除以不處理組別的 CFU，算出存活率(survival rate)。

【上皮細胞黏附試驗(Epithelial cell adhesion assay)】 [6]

實驗材料:

Medium: RPMI-1640(含 10% FBS 和 antibiotic-antimycotic[Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B 之三合一抗生素])，cell lysis solution: 1% Triton X-100, 0.05% trypsin

實驗方法:

1. 將人類膀胱癌上皮細胞 BFTC-905 以 1 ml 含有 10% FBS (HyClone) 及抗生素的 RPMI-1640 (Gibco)，起始細胞濃度為 5×10^5 cells/ml，培養在 12 孔盤中。
2. 以 5% CO₂，37°C 培養約兩天，細胞全貼附底部時可進行實驗。
3. 取隔夜菌液以 RPMI-1640 調整濃度至 MOI (Multiplicity of infection)=10，所



需菌量(5×10^6 CFU/well)。

4. 細胞以 PBS 清洗兩次後，加入調配好的 1 ml 菌液。
5. 以 500 g 37°C 離心 10 分鐘後，於 37°C 培養 1 小時。
6. 以 PBS 清洗 2 次，加入 1 ml cell lysis solution (1% Triton X-100 in PBS) 置於 37°C 培養 5 分鐘，取出上清液序列稀釋點盤，隔天計算菌落數目除以初始下的菌落數計算細胞黏附率。



【細胞入侵試驗(Cell invasion assay)】 [38]

實驗材料:

Medium: RPMI-1640(含 10% FBS 和 antibiotic-antimycotic[Penicillin , Streptomycin , Amphotericin B 之三合一抗生素])，cell lysis solution: 1% Triton X-100 , 0.05% trypsin

實驗方法:

1. 選用人類膀胱癌上皮細胞 BFTC-905 作為細胞入侵試驗的宿主細胞。將該細胞以 5×10^5 /ml/well 養在含有 10 % FBS 的 RPMI-1640 的 12 孔盤中，當細胞長到 9 分滿的時候即可進行實驗 (約兩天)。
2. 實驗前一天挑選野生株及突變菌株的單一菌落接種於 5ml LB broth 中隔夜。
3. 隔夜菌液以 PBS 清洗後，以 RPMI-1640 調整濃度至 $\text{MOI}=10$ ，所需菌量 (10^6 CFU/well)。
4. 細胞以 PBS 洗 2 次，加入調配好的 1 ml 菌液，置於 37°C 培養箱中培養 60 分鐘。
5. 吸去上清液的細胞再 PBS 清洗兩次，加入 1 ml 含有 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 的 RPMI-1640，再放入 37°C 培養箱中作用 60 分鐘，殺死細胞外的細菌。

6. 吸去上清液後再用 PBS 清洗 2 次，利用顯微鏡觀察細胞的完整性。
7. 吸乾 PBS 再加入 1 ml cell lysis solution，稍微沖刷底部的細胞，放入 37°C 培養箱中作用 30 分鐘使細胞完全破裂。
8. 將該液體吸出後作序列稀釋並塗盤，隔天計算長出的菌落數目。

Invasion ratio = CFU after lysing cells/ inoculated bacteria

【促發炎細胞因子表現量分析(cytokine gene expression quantification)】 [39]

實驗材料:

Medium: RPMI-1640(含 10% FBS)，TRIzol (IPROTECH TECHNOLOGY)，chloroform，isopropanol，75%酒精 (以 DEPC 水配置)，DEPC 水，Invitrogen SUPERSRIPTTM III Reverse Transcriptase

實驗方法:

1. 選用人類膀胱癌上皮細胞 T24 作為細胞入侵試驗的宿主細胞。將該細胞以 5×10^5 /ml/well 養在含有 10 % FBS 的 RPMI-1640 的 12 孔盤中，當細胞長到 9 分滿的時候即可進行實驗 (約兩天)。
2. 實驗前一天挑選野生株及突變菌株的單一菌落接種於 5 ml LB broth 中隔夜。
3. 隔夜菌液以 PBS 清洗後，以 RPMI-1640 調整濃度至 $MOI=10$ ，所需菌量 (10^6 CFU/well)。
4. 細胞以 PBS 洗 2 次，加入調配好的 1 ml 菌液(單次實驗野生株及突變株分別加入三格孔盤中)，並在另外三格孔盤加入無菌液之 RPMI 作為 negative control，最後萃取細胞 RNA 時集中同一管以增加細胞 RNA 數目)，置於 37°C 培養箱中培養 60 分鐘。
5. 培養後把 medium 去除。
6. 以 1 ml TRIzol 混合均勻。(每一孔加入約 333 μ l 再移至 1.5 ml 微量離心

管)

7. 接著以 RNA 萃取法把細胞 RNA 萃取，細胞 RNA 會呈白色並集中於微量離心管之底部。
8. 加入 20 μ l 55 °C DEPC 水溶解 RNA，確定 RNA 品質及測定其濃度後即可轉 cDNA。
9. 將得到的 cDNA 產物添加 180 μ l ddH₂O 儲存於-20°C 冰箱中。
10. 以 RT-qPCR 實驗進行分析，選用 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)的引子作為 internal control。

【巨噬細胞(THP-1)存活能力試驗】 [6]

實驗材料:

Medium: RPMI-1640(含 10% FBS)，1 mg/ml PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate，Sigma，溶於 DMSO)，250 μ g/ml streptomycin RPMI-1640 medium，
cell lysis solution: 1% Triton X-100 in PBS

實驗方法:

1. 選用 Human leukemia monocytic cell line (THP-1)。將 10^6 的細胞懸浮於 10 ml 含有 10 % FBS 的 RPMI-1640 並接種在 9 cm petri dish，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中靜置三天。
2. 將細胞轉至 50 ml 離心管以 500g 室溫離心 5 分鐘後去上清液，利用含 10% FBS 的 RPMI-1640 及 50 ng/ml PMA 將細胞調整成 10^5 cell/ml 後接種至 12 well plate (1ml/well)，培養於 37°C、5% CO₂ 培養箱中靜置三天。
3. 實驗前一天將菌株接種於 5 ml LB broth 中震盪培養於 37°C。
4. 以 RPMI 1640 調整菌量至 10^6 CFU/ml。
5. 去除細胞培養液後以 PBS 清洗 2 次(清洗完後可利用顯微鏡查看細胞狀態)。
6. 每個 well 分別加入 1 ml 含有 10^6 CFU 菌量之培養基，將 12 well plate 以

30°C、500g 離心 5 分鐘後，在於 37°C 靜置 30 分鐘。以 PBS 清洗細胞 1 次，加入含 250 µg/ml streptomycin 的 RPMI-1640 medium 並置於 37°C 中處理 1 小時以殺死胞外之細菌。

7. 以 PBS 清洗細胞一次，並加入含有 250 µg/ml streptomycin RPMI-1640，置於 37°C 培養 1 小時以殺死胞外菌，以 PBS 清洗細胞兩次，於 1 小時及 4 小時的孔中加入 RPMI-1640 並至於 37°C 進行培養。

8. 分別在培養 1 小時及 4 小時後將細胞以 PBS 清洗一次後加入 1 ml cell lysis solution(1% Triton X-100 in PBS)於 37°C 靜置 5 分鐘。

9. 取出上清液序列稀釋點盤，隔天計算菌落數目，並以第 4 小時菌落數除以第 1 小時菌落數計算巨噬細胞內存活率。

【動物實驗(Animal model of UTI)】 [40]

實驗材料:

重量 $\geq$ 0.24 g *Galleria mellonella* 幼蟲，注射器

實驗方法:

1. 將 *P. mirabilis* 接種於 5 ml LB broth 並震盪培養於 37°C。
2. 隔夜培養菌液以 PBS 調整至所需菌量 (10^5 CFU/ml 及 10^4 CFU/ml)。
3. 序列稀釋 10^0 - 10^7 後點盤至 LSW plate(triplication)。
4. 培養隔夜，計算 CFU。
5. 以注射器，將 10 µl 培養菌液注入幼蟲的倒數第二個前足。
6. 觀察感染期間的存活率。

【穿透式電子顯微鏡(TEM)樣本之前處理】

1. 將待測菌株接種於 1 ml LB broth 中於 37°C 培養箱以 200 rpm 震盪培養隔夜。

- 
2. 取 100 μ l 隔夜菌液塗滿 luria plate，並於 37°C 培養箱培養 5 小時。
 3. 取 500 μ l 菌液以 1,000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液以 1 ml PBS 清洗 3 次，再以 100 μ l PBS 回溶。
 4. 取其中 10 μ l 滴在 formvar-coated grid (Electron Microscopy Sciences)上，20 分鐘後用吸水紙將殘餘液體吸乾，在室溫下靜置 10 分鐘。
 5. 取 10 μ l 37°C 預熱過的 1 % PTA 滴在 grid 上，等待 15 秒後用吸水紙吸乾，室溫下靜置 16 小時後，委請國立台灣大學第一共研冷凍電子顯微鏡核心-劉淦光老師，利用電子顯微鏡觀察。

【細菌外膜 (outer membrane) 測定】 [41]

實驗材料:

20 mM HEPES，1% sarkosyl NL-97 (Sodium N-Dodecanoyl sarcosinate) in 20 mM HEPES

實驗方法:

1. 挑選單一菌落接種於 5 ml LB broth 中，在 37°C 震盪培養隔夜。
2. 1:100 Subculture 於 100 ml LB broth，以 37°C 培養 18 小時。
3. 離心去除上清液，用 5 ml 20 mM HEPES 將細菌懸浮。將其置於冰上利用超音波震盪將細菌打破，每一管打 25 個循環，每次循環打 20 秒、停 40 秒，注意全程保持低溫。
4. 將震破的細菌以 12,000 rpm、4°C 離心 10 分鐘。
5. 收集上清液約 3 ml 轉移至高速離心管中，以 38,200 rpm 的轉速、4 °C 離心 1 小時。
6. 去除上清液後再加入 1 ml 20 mM HEPES 將沉澱物懸浮洗淨，再以 38,200 rpm、4°C 離心 30 分鐘，去除上清液。
7. 取 1 ml 含 1 % sarkosyl NL-97 的 20 mM HEPES 將沉澱物懸浮，置於

30°C 在 95 rpm 震盪下作用 60 分鐘至沉澱物完全溶解。

8. 將檢體轉移至超高速離心管，以 42,000 rpm 的轉速、4°C 離心 30 分鐘，去除上清液（此上清液為細菌的內膜）。

9. 再次加入 1 ml 含 1 % sarkosyl NL-97 的 20 mM HEPES，清洗沉澱物（此沉澱物即為細菌的外膜）。

10. 再次離心 42,000 rpm、4°C 離心 30 分鐘，將上清液完全去除乾淨。

11. 最後加入 50 µl PBS 及 1.5 µl 40 mM PMSF 將蛋白質回溶。

12. 利用蛋白質染色劑 (Bio-Rad protein assay dye reagent) 測定蛋白質濃度，各取 10 µg 利用 15% SDS-PAGE 分析，以低分子量標準蛋白質 (SDS-PAGE Standards, Low range, Bio-Rad) 做標記。剩下的蛋白質置於-20°C 冰箱中儲存。

【蛋白質濃度測定】

實驗材料:

Bio-Rad protein assay dye reagent

NEW ENGLAND BioLabs®Inc. 10 mg/ml BSA 標準品

實驗方法:

1. 96 孔盤的 well 分別加入 148 µl 二次水，再加入 2 µl 標準品 (0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml) 或樣品。

2. 加入 40 µl 5X protein dye 均勻混合後加入 10 µl 100% isopropanol 以消除氣泡。測其 OD₅₉₅ 數值並畫出標準曲線後計算未知樣品之蛋白濃度 (mg/ml)。

【不連續膠體電泳(SDS-PAGE)】

實驗材料:

SDS-PAGE 5X running buffer: 15 g Tris, 72.5 g glycine, 5 g SDS 加二次水至 1 L

4X SDS-PAGE sample buffer: 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8) , 1 ml beta-mercaptoethanol

3X Sample buffer: 62.4 M Tris-HCl (pH 6.8) , 24.99% glycerol , 2.01% SDS , 0.51% bromophenol blue , 3.01% beta-mercaptoethanol

1 ml 20% SDS , 2 mg Bromophenol blue , 1 ml glycerol , 13 ml 二次水

Coomassie Brilliant Blue R (CBR) 染色劑: 1.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 用 250 ml 甲醇(methanol)溶解後 , 再加入 250 ml 二次水及 50 ml 醋酸(acetic acid)

CBR 脫色劑: 7%醋酸 , 25%甲醇的水溶液

10% APS (Ammonium persulfate)

實驗方法:

1. 鑄膠器清洗乾淨後 , 用拭鏡紙沾少許 75%酒精擦拭乾淨 , 將其組合後架立並固定 , 加入二次水測試有無漏水 , 確認其組合緊密無縫後 , 使用濾紙將注膠空間的水吸乾 , 並注入膠體溶液 , 膠體溶液配置如下:

(2 片量)	上膠 5% (ml) (stacking gel)	下膠 12% (ml) (separating gel)
二次水	3.025	4.3
Tris-HCl	1.25 (0.5 M Tris-HCl , pH 6.8)	2.5 (1.5 M Tris-HCl , pH 8.8)
40% acrylamide	0.625	3
10 % SDS	0.05	0.1
10 % APS	0.05	0.1
TEMED	0.005	0.005
Total	5.005	10

2. 下膠依上述比例混合均勻後注入鑄膠器至約 8 分滿 , 於上面加上一層 100%

isopropanol 以消除氣泡。

3. 靜置 25 分鐘後移除 isopropanol，可見下膠上緣已明顯平整，以濾紙吸乾殘留液體後加入上膠到鑄膠器注滿，插入樣品槽齒模後再靜置 15 分鐘等待膠體凝固。

4. 膠體凝固後取下並以二次水稍微清洗即可組裝並放入電泳槽，在電泳槽內加入 1X running buffer 直至覆蓋住所有的樣品槽。

【蛋白樣本處理觀察】

1. 將蛋白樣本與 6X sample dye 依比例混合均勻後於 95°C 乾熱器加熱 10 分鐘，冷卻後將混合物注入 SDS-PAGE 的樣品槽，而未加入樣品的 well 則加入 1X sample dye。

2. 電泳分析時，先以 50 V 進行電泳，待樣品跑到上下膠交界處並呈一細線後，再將電壓調整至 100 V。

3. 跑完電泳後將膠片取下，移除上膠後，使用 Coomassiae Brilliant Blue R 染色劑染色 20 分鐘，此後用二次水稍加沖洗後放入脫色劑中脫色 20 分鐘，並用二次水脫色隔夜，在盒子中放入一張紙巾，可以加速脫色。



第六節 基因表達

【Reporter assay】[42]

實驗材料:

Assay buffer: 50 mM potassium phosphate buffer , 10% acetone (破菌用)

100 ml 500 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5): 1.29 g KH_2PO_4 , 7.05 g K_2HPO_4

實驗方法:

< Transcriptional level>[51]

建構目標基因的啟動子與 *xylE* 基因於 pACYC-184 載體(附錄六):

1. 設計 5'端帶有 *SphI* 切位之 forward primer 以及 5'端帶有 *BamHI* 切位之 reverse primer , 將目標基因起始密碼子上游約 800 bp (可能包含啟動子位置之區域) 利用 PCR 合成放大 , 並跑膠確認片段大小是否符合預期。
2. PCR 純化後 , 利用 TA cloning 方法將啟動子的序列片段轉型至 DH5 α 中 , 抽取質體 DNA 並以 *SphI* 及 *BamHI* 確認為目標質體。
3. 以 *SphI* 及 *BamHI* 作用於帶有啟動子基因的 pGEM-T Easy vector (5 μg) 與建構好之 pACYC184-ara- *xylE* vector (5 μg) 。
4. 將酵素作用後帶有啟動子基因(insert)的 pGEM-T Easy 與 pACYC184-ara- *xylE* 質體(vector)進行膠體純化 , 之後進行黏合反應並轉型入勝任細胞中 , 以 chloramphenicol 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 進行篩選 , 再利用限制酶作用確認。
5. 將質體 DNA 轉型入目標菌株中 , 以 chloramphenicol 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 進行篩選。

Catechol-2 , 3-dioxygenase (C23O) assay:

1. 將 37°C 隔夜培養於 LB broth 的菌液以 1:100 稀釋於 10 ml LB broth 中 , 置於 37°C 培養箱中培養 , 分別在第 3、5、7、24 小時取出。
2. 以 10 倍稀釋菌液記錄 OD₆₀₀ 數值 , 再取 1 ml 菌液以 12,000 rpm 離心 1 分鐘 , 去除上清液。



3. 分析前，加入 1 ml assay buffer，劇烈搖晃 (vortex) 破菌，視情況以 assay buffer 進行稀釋並記錄稀釋倍率 (dilution factor)。
4. 取 1 ml 適當稀釋後之樣本加至 cuvette 中，以分光光譜儀在波長 375 nm 下 set reference，之後加入 10 μ l 的 0.1 M pyrocatechol 充分混勻後，再以分光光譜儀偵測在波長 375 nm 下之吸光值 (反應時間 3 分鐘，每 10 秒偵測 1 次)。
5. 利用公式計算酵素活性:

Enzyme activity (nmole catechol / min / OD₆₀₀)

$$= \text{slope } (\Delta A / \Delta \text{min}) / 22000 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}) / 1000 / \text{OD}_{600} \times \text{dilution factor} \times 10^9$$

【EMSA 表現及純化 His-tagged CRP 蛋白】

實驗材料：

1 M IPTG

PBS buffer (1.36 g Na₂HPO₄，0.12 g KH₂PO₄，4 g NaCl，0.1 g KCl，調整 pH = 7.4，補水至 500 ml，滅菌後使用)

Native binding buffer (20 mM NaH₂PO₄，pH 7.4，500 mM NaCl，30 mM imidazole) 1.24g NaH₂PO₄，4.36g Na₂ HPO₄，11.688g NaCl，0.816924g imidazole
10 mM PMSF

Native elution buffer (20 mM NaH₂PO₄，pH 7.4，500 m M NaCl，500 mM imidazole) 1.24g NaH₂PO₄，4.36g Na₂ HPO₄，11.688g NaCl，13.6154g imidazole/400 ml

Interaction buffer (150 mM KCl，30 mM Tris-HCl pH 8.0，10 mM MgCl₂)
4.473078g KCl，1.45368g Tris-HCl pH 8.0，0.380844g MgCl₂/400 ml

實驗方法:

His-tagged 蛋白純化使用 His GraviTrap (cytiva)，步驟則參考 kit 所附說明書。

1. 取 BL21 pET15b : *cueR* 凍菌直接接種至含 100 μ g/ml Amp 的 LB broth 中，

37°C震盪培養 O/N。

2. 隔天取 2 ml 菌液至 200 ml 含 100 µg/ml Amp 的 LB broth 中(1:100 稀釋)，
37°C震盪培養 2.5 小時。
3. 加入 50 µl 1M isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (最終濃度為 0.25 mM)，置於 23~25°C之間震盪培養 6 小時。
4. 將 200 ml 菌液移至 50 ml 離心管，以 9,000rpm 離心 5 分鐘，之後倒掉上清液，每管以 30 ml PBS wash 一次，最後將 pellets 至於-20°C O/N。
5. 隔天將全部的 pellets 回溶於 17.5 ml PBS 中。
6. 加入 1 ml 10 mM PMSF(最終濃度為 100 µg/ml)，置於 4°C滾動混合 3 分鐘。
7. 接著以 sonication 破菌(設定打 15 秒、停 10 秒、Amp 40%，共打 10-20 分鐘至澄清)。
8. 以 39,000g 離心 20 分鐘，之後收集上清液。
9. 17.5 ml 含 30 mM imidazole 的 native binding buffer，保存於 4°C冰箱。
10. 切斷底部尖端，取下頂蓋。將 column 放在支架上並靜置 column 5 分鐘使多餘的液體流出。
11. 將 ddH₂O 加至 column 中，清洗三次。將含 30 mM imidazole 的 native binding buffer 加至 column 中，清洗二次。
12. 將含 His-tagged CueR 蛋白的上清液加至已含 30 mM imidazole native binding buffer wash 過的 column 中。
13. 之後靜置 column 5 分鐘使 agarose 自然沉降，移除 column 底部的 cap 使液體流出。
14. 加入 35 ml 含 30 mM imidazole 的 native binding buffer，同樣靜置 column 5 分鐘使 agarose 自然沉降移除 column 底部的 cap 使液體流出。
15. 最後加入 3 ml 含 500 mM imidazole 的 native elution buffer 將 His-tagged CueR 沖出，並收集於 15 ml 離心管中。



16. 將 elute 出的 3 ml His-tagged CueR 移至 Pierce™ Protein Concentrators，PES 蛋白質濃縮過濾管中，以 8,000 g 離心 30 分鐘（共約 15 次，共約 8 小時）過濾至最後約剩 30 μ l，即為濃縮後的 CueR 蛋白，可將蛋白保存於 4°C 中以利後續實驗進行。

【RNA 抽取】

實驗材料:

TRIzol (PROTECH TECHNOLOGY)，chloroform，isopropanol，75%酒精（以 DEPC 水配置），DEPC 水

實驗方法:

1. 取隔夜培養的菌液 spread 於 1.5% LB agar plate，培養 5 小時後取菌量 1 ml ($OD_{600}=1.2$)之菌液，以 12,000 rpm 離心 1 分鐘收集菌塊，並以 DEPC 水 wash 2 次，去上清液後懸浮菌塊。
2. 加入 1 ml TRIzol (PROTECH TECHNOLOGY) 後，混合均勻。
3. 加入 200 μ l chloroform，劇烈震盪 15 秒後，在室溫下靜置 5 分鐘，以 12,000g 於 4°C 離心 15 分鐘。
4. 將含有 RNA 的上清液（無色透明）約 600 μ l 移至新的微量離心管。
5. 加入 600 μ l isopropanol 上下翻轉混合均勻，在室溫下靜置 10 分鐘，12,000g 4°C 離心 15 分鐘，去除上清液。
6. 加入 1 ml 75%酒精，以 12,000g 4°C 離心 5 分鐘，去除上清液。
7. 置於抽風櫃內將離心管倒扣風乾 5 分鐘。
8. 加入適量 (20 μ l) 56°C 的 DEPC 水，反覆沖刷管壁溶解 RNA，於 56°C 下靜置 10 分鐘。
9. 取 3 μ l RNA 跑 1% agarose gel 確定 RNA 品質，並測定 RNA 濃度，即可轉 cDNA 或保存於 -80°C 冰箱中。

【RNA 反轉錄】

實驗材料:

使用 Invitrogen SUPERSRIPT™ III Reverse Transcriptase，步驟則參考 kit 所附之說明書。

實驗方法:

1. 取 2/3 µg RNA 於 200 µl 微量離心管中，加入 1 µl DNase I Reaction Buffer 及 1 µl DNase I 去除殘餘的 DNA，並補 DEPC 水至 10µl，於 37°C 反應 30 分鐘。
2. 再加入 1 µl 50 mM EDTA，混合均勻後於 65°C 反應 10 分鐘，然後置於冰上 1 分鐘。
3. 取 8 µl DNase I 處理過的 RNA，加入 1 µl random hexamer primer 及 1 µl 10 mM dNTPs，混合均勻後於 65°C 水浴反應 5 分鐘，然後置於冰上 1 分鐘。
4. 於另一微量離心管混合下列物質後取 10 µl 加入上述之 RNA 混合液中:

試劑	體積 (µl)
10X RT buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0.1M DTT	2
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1
總體積	10

4. 混合均勻後，移至 PCR 溫度控制器中並設定條件 (於 25°C 下反應 10 分鐘，50°C 反應 50 分鐘，最後以 85°C 作用 5 分鐘)。
5. 將得到的 cDNA 產物添加 80 µl ddH₂O 儲存於-20°C 冰箱中。

【同步定量 PCR(Realtime PCR)】

實驗材料:

使用 ORATM SEE qPCR Green ROX L Mix 及 qPCRBIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX，實驗步驟參考 kit 所附說明書。使用 ABI QS3 型機器。

實驗方法:

1. 一個 reaction 的反應配置如下:

試劑	體積 (μl)	
	Sample	Internal
SYBR® Premix	12.5	12.5
PCR primer mixture (5 μM)	0.75	0.75
cDNA	10	2
dH ₂ O	1	9
總體積	25	25

2. 將上述混合物加到八連排管或是 96 well plate 中，其中測定目標基因之 cDNA 取原液 2 μl，以 *gyrB* (DNA gyrase, subunit B) 當作 internal control。
3. 配製好後放入 ABI-7500 中進行反應，設定為 (shuttle PCR; 2 step PCR): 95°C 20 秒、95°C 10 秒、60°C 30 秒，共跑 40 個 cycle。
4. 所得之結果經儀器分析會換算成 Ct 值，將欲測基因的 Ct 值減 *gyrB* 基因的 Ct 值得 ΔCt ，利用預測基因的 mRNA 表現量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的公式來計算預測基因的 mRNA 相對表現量。

【IE assay】

1. 將 N₂ 及 *hha* mutant 種於 1 ml LB 並震盪隔夜培養於 37 °C。
2. 以 1:100 稀釋至 5 ml LB，放入 37 °C 震盪培養至 OD₆₀₀=1。

3. 各取 1 ml 隔夜培養 (至少 26 小時)及 OD₆₀₀ 約等於 1 的菌液於 1.5 ml 微量離心管，離心去上清液，並用 PBS 清洗 3 次。
4. 抽取 genomic DNA。
5. 以 PCR 擴增出 *mrp* operon 的 promoter，再以 PCR purification kit 純化產物。
6. 進行 DNA 電泳，並用電泳結果將產物濃度調整成一樣。
7. 以 *Afl*III 切割 PCR 產物後進行電泳。



第三章 實驗結果



第一節 篩選對銅高感受性之突變株

【以跳躍子卡匣子突變方法構建出對銅高感受性之突變株】

利用 mini-Tn5 transposon mutagenesis 系統對 *P. mirabilis* N₂ 野生株進行突變。將帶有 pUT-Tn5 質體的 *E. coli* S17-1 與 *P. mirabilis* 野生株進行結合生殖，使 Km1 cassette 隨機插入 *P. mirabilis* 野生株的基因體中，從而構建出抗 kanamycin 的突變菌。因 *P. mirabilis* 野生株在 LSW plate 上可抗的最高銅濃度為 3.25 mM CuCl₂，故以含 3.25 mM CuCl₂ 的 LSW plate 來篩選出對銅感受性上升的突變菌株。實驗室在篩選突變株後，得到對銅感受性上升之突變菌株，其中一株為本篇研究對象。

【鑒定突變株之突變基因】(圖一)

為分析出被 Km1 cassette 所破壞的基因為何，本篇用 Km1 cassette 上已知的 I-out、O-out 以及 O-out 2.0 搭配隨機設計之引子對 Km1 cassette 附近的基因進行 Nested PCR，將 PCR 擴增片段進行定序，將結果與 NCBI 上 *P. mirabilis* HI4320 的序列進行比對，即可知 Km1 cassette 附近的基因為何，此後再設計位於該基因上的引子並對該基因進行 PCR 和定序，以確認卡匣插入 wild type 基因組的確切位置，即可將 Km1 cassette 插入之基因及其上下游基因序列在 Lasergene 軟體中繪製出。依照上述分析方法分析出對銅感受性上升之突變株為 *hha* 突變株 (圖一)。

【確定突變株之突變基因】(圖二)

設計一對引子對該基因及抗藥卡匣進行 PCR 和定序，以確認抗藥卡匣插入 wild type 基因組的確切位置。結果表明在突變株中插入了一個 Km cassette (圖

二)，由此 PCR 結果顯示出的 DNA 片段大小亦與理論上 *hha* 突變株含 kanamycin resistance gene 序列的上游及下游 DNA 片段大小一致。



【比對 *P. mirabilis* 與其他細菌的相似度】(圖三)

本篇利用 NCBI Blast 對 *E. coli*、*Salmonella* Typhimurium 及 *P. mirabilis* 中 Hha 之胺基酸序列進行分析，結果顯示 *P. mirabilis* (*Pm* str. N₂) 中 Hha 胺基酸序列與 *E. coli* K12 和 *Salmonella* Typhimurium (LT2) 相比有著約 97% 的相似度 (圖三)。

【*hha* 與上游基因 *tomB* 組成一個 operon】(圖四)

Hha-TomB TA 系統於 Proteobacteria 間具高度保留性，據研究報導 *hha* 與上游基因 *tomB* 組成一個 operon。本篇利用 NCBI Blast 對 *E. coli*、*Salmonella* Typhimurium 及 *P. mirabilis* 中 TomB 及 Hha 之胺基酸序列進行分析，結果顯示 *P. mirabilis* (*Pm* str. N₂) 中 TomB 胺基酸序列與 *E. coli* K12 和 *Salmonella* Typhimurium (LT2) 相比有著約 64% 的 identity 及 38% 的 similarity，而 *P. mirabilis* (*Pm* str. N₂) 中 Hha 胺基酸序列與 *E. coli* K12 和 *Salmonella* Typhimurium (LT2) 相比有著約 97% 的 identity 及 84% 的 similarity。我們懷疑 *hha* 與上游基因 *tomB* 組成一個 operon，影響 *hha* 對 *P. mirabilis* 毒力因子的作用。為證明此點，本篇亦利用野生株的 mRNA 透過 PCR 反應分析，並確認兩者為同一 operon (圖四)。

第二節 Hha-TomB Toxin-Antitoxin System 對生長的影響

【Hha-TomB Toxin-Antitoxin System 對生長的影響】(圖五)

由於有文獻指出 Hha 和 TomB 形成一個真正的 TA 系統，其中 Hha 充當毒素，而 TomB 充當抗毒素[43]。*P. mirabilis* *hha* 和 *tomB* 目前已證明為同一

operon，但尚未知道 *P. mirabilis* Hha-TomB 是否為 TA pair。另外，由於有文獻指出 Hha 充當毒素，共同表達的 TomB 可減弱 Hha 毒性[44, 45]。所以將 *hha* 單獨過表達與將 *tomB* 和 *hha* 的共表達來探討 *P. mirabilis* Hha-TomB 是否為 TA pair。首先觀察野生株、過表達突變株的生長狀況，結果顯示 *hha* 的單獨過表達導致生長情況較差，*tomB* 的共表達完全恢復了生長情況，而 *tomB* 的單獨過表達的生長曲線相較於野生株並無顯著差異（圖五）。代表 TomB 會保護 *P. mirabilis* 細胞免受 Hha 毒性。之後實驗均有將處於 log phase 中的菌 OD₆₀₀ 調為一致後再進行實驗，從而減小了生長對其毒力相關實驗的影響。

第三節 突變株對銅之感受性

【*hha* 突變株不影響 *P. mirabilis* 生長】（圖六）

首先觀察野生株、*hha* 突變株的生長狀況，結果顯示 *hha* 突變株的生長曲線相較於野生株並無顯著差異（圖六），證明後續實驗中之差異並非因生長速率不同所導致。

【*hha* 突變株對銅之感受性】（圖七）

因 *P. mirabilis* 野生株在 LSW plate 上可抗的最高銅濃度為 3.25 mM CuCl₂，故以含 3.25 mM CuCl₂ 的 LSW plate 來篩選出銅感受性較高的本篇突變株 *hha*。為提供一個含明確銅濃度的環境，本篇利用化學成分確定之培養基 GM 進行實驗。比較野生株與 *hha* 突變株在不同濃度之銅加入 GM broth 中的生長狀況，結果表明於 100 及 500 μM CuCl₂ 中野生株及 *hha* 突變株之生長曲線均顯著下降，其中 *hha* 突變株之生長曲線顯著低於野生株之生長曲線（圖七 A），我們再透過野生株和 *hha* 於含 2.5 mM 銅之 LSW plate 上點盤，隔天檢查結果發現 *hha* 在含 2.5 mM 銅的 LSW plate 相比野生株生長情形較差（圖七 B），表示 *hha* 和野生株在有銅的 agar plate 環境下對銅的感受性有一定的差別。為提供一個與人

體環境相似的環境，故接著測試分別在有氧條件和厭氧條件下以較低濃度的 0, 0.05, 0.2 及 1 mM CuCl₂ 的 LSW plate 點盤，發現 *hha* 的存活率對比野生株有下降趨勢（圖七 C），推測 *hha* 可能透過其他機制產生抗銅反應。另外發現，在厭氧條件下即使是以 0 mM CuCl₂ 的 LSW plate 點盤，*hha* 的存活率對比野生株也有下降的趨勢，表示在厭氧條件下 *hha* 突變會影響生長情況。

【*hha* 單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株對銅之感受性】（圖八）

接著測試以 1 mM CuCl₂ 的 LSW plate 點盤，發現 *hha* 突變株及 *hha* 的單獨過表達株的存活率對比野生株有下降趨勢，*tomB* 的共表達完全恢復了對銅之感受性（圖八 A, B），代表 TomB 會緩解 Hha 過表達的 Cu 毒性。

【*hha* 突變株之 *rpoE*、*rscB*、*cueR* promoter 活性較野生株顯著下降】（圖九）

根據文獻報導，*rpoE* 突變株降低了細菌銅抗性[46]。*rscB* 突變菌株對高濃度銅的抗性性發生了改變[47]。已知 CueR 在 *Acinetobacter baumannii*[48]、*Salmonella Typhimurium*[49]、*E. coli* [50]、*Pseudomonas aeruginosa*[51]等菌體中扮演著維持銅濃度恆定之角色。由於 envelope protein 改變會影響對銅的感受性[52]。在 *P. mirabilis*，RpoE [53] 及 RcsB[54]皆參與維持外膜穩定。因此進行 reporter assay 檢測 Hha 是否影響其啟動子活性。而實驗結果顯示，*hha* 突變株之 *rpoE*、*rscB*、*cueR* promoter 活性皆較野生株顯著下降（圖九）。

第四節 *hha* 突變株之表現型分析

【*hha* 突變株及 overexpression 之泳動能力(swimming)較野生株顯著下降】（圖十）

Swimming 為 *P. mirabilis* 處於液態環境中之移動方式，可比擬細菌於尿液中之運動性，因此我們接著比較野生株與 *hha* 突變株於半流體培養基中的泳動

能力，結果顯示 *hha* 突變株之泳動能力相較於野生株顯著下降(圖十 A)。*hha* 的單獨過表達導致泳動能力對比野生株有下降趨勢，*tomB* 的共表達完全恢復了泳動能力(圖十 B)，代表 TomB 可緩解 *P. mirabilis* Hha 過表達造成之泳動能力缺失。

【*hha* 突變株鞭毛量顯著低於野生株】(圖十一)

菌體鞭毛的多寡為影響 *P. mirabilis* 運動性之重要因素，而由上述實驗可知 *hha* 的缺失造成細菌 swimming 下降，因此檢測其鞭毛生成能力是否受 *hha* 影響。以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察野生株與 *hha* 突變株之鞭毛量差異，結果亦顯示 *hha* 突變株之鞭毛量顯著低於野生株(圖十一)。

【*hha* 突變株之表面移行能力(swarming)較野生株顯著下降】(圖十二)

表面移行(Swarming)為 *P. mirabilis* 一重要毒力因子，可助其沿著輸尿管上行感染至腎臟，擴大侵犯面積，先前研究亦顯示，*hha* 的缺失會影響 *E. coli* 之 swarming 能力[29]，故比較野生株與 *hha* 突變株之 swarming 能力，結果顯示 *hha* 突變株表面移行能力相較於野生株顯著下降 (圖十二 A)。*hha* 的單獨過表達導致表面移行能力對比野生株有下降趨勢，*tomB* 的共表達完全恢復了表面移行能力(圖十二 B)，代表 TomB 會緩解 *P. mirabilis* Hha 過表達造成之移行能力缺失。

【*hha* 突變株之菌體較野生株短小】(圖十三)

菌體分化(differentiation)狀況會影響細菌表面移行，當 *P. mirabilis* 表面移行時會分化成菌體較長的 swarmer cell，而由上述實驗可知 *hha* 的缺失造成細菌 swarming 能力下降，因此檢測野生株與 *hha* 突變株菌體長度。結果可知，*hha* 突變株的菌體長度在表面移行期間(第 5 小時)顯著短於野生株(圖十三)。

【*hha* 突變株之 *flhDC* promoter 活性較野生株顯著下降】(圖十四)

由上述表現型分析結果可知 *hha* 突變株之運動性下降，而其中的基因調控機制為接下來欲探討之目的。*hha* 突變株之表面移行能力、泳動能力皆下降，而 FlhDC 為調控運動性之 major regulator，故將含有 *flhDC* promoter 之 reporter plasmid 送入野生株及 *hha* 突變株中，檢測其在 1.5% Luria agar plate 上之 promoter 活性。結果顯示 *hha* 突變株之 *flhDC* promoter 活性較野生株顯著下降(圖十四)。

【*hha* 突變株之生物膜形成能力顯著下降】(圖十五)

因 *P. mirabilis* 易於尿管及結石表面形成生物膜，故比較野生株及 *hha* 突變株的生物膜形成能力，結果表明 *hha* 突變株之生物膜形成能力相較於野生株顯著下降(圖十五 A)。*hha* 的單獨過表達導致生物膜形成能力對比野生株有下降趨勢，*tomB* 的共表達完全恢復了生物膜形成能力(圖十五 B)，代表 TomB 會緩解 *P. mirabilis* Hha 過表達造成之生物膜形成能力缺失。

【*hha* 突變株之 eDNA 生成量顯著下降】(圖十六)

影響生物膜形成之物質有很多，例如 eDNA。故本篇亦對 eDNA 進行分析。實驗結果表明 *hha* 突變株之 eDNA 生成量顯著下降(圖十六)，由此推測 *hha* 突變株之生物膜形成量下降和其 eDNA 生成量下降有關。

【*hha* 突變株之 *pmpA* promoter 活性較野生株顯著下降】(圖十七)

PmpA 是 fimbrial major subunit[55]，文獻指出纖毛有助 *P. mirabilis* 形成生物膜[56]，因此我們懷疑有相關纖毛蛋白的減少導致 *hha* 突變株的生物膜形成能力下降，故將檢測 *pmpA* 這個對感染力有貢獻之纖毛相關基因 promoter 的活性[57]，並由實驗結果可知，*hha* 突變株中 *pmpA* promoter 活性顯著低於野生

株，指出 Hha 正調控 *pmpA* 的表現。當 Hha 失活時，*P. mirabilis* 會透過減少 PmpA 纖毛蛋白降低其生物膜生成能力(圖十七)。



【*hha* 突變株之 *mrp* 表現量較野生株顯著下降】(圖十八)

MR/P fimbriae 幫助 *P. mirabilis* 附著於泌尿道，其 phase ON/OFF 的轉換可能造成逃避宿主免疫系統辨識[58]，但是轉換的控制目前並不清楚。本實驗結果發現 *hha* mutant 的 phase ON 變少了 (圖十八)，似乎 *mrp* promoter 的轉換會受到 Hha 影響。

【*hha* 突變株之尿素酶活性較野生株顯著下降】(圖十九)

尿素酶為 *P. mirabilis* 的重要毒力因子之一，可將尿素分解成銨離子與二氧化碳，使尿液 pH 值升高並促進尿結石形成[1-3]，而此亦提供細菌一個可貼附形成生物膜之平台，促進感染歷程，故比較 *hha* 突變株與野生株之尿素酶活性。結果顯示 *hha* 突變株對比野生株之尿素酶活性顯著下降(圖十九 A)。*hha* 的單獨過表達導致尿素酶活性對比野生株有上升趨勢，*tomB* 的共表達完全恢復了尿素酶活性(圖十九 B)，代表 TomB 可緩解 *P. mirabilis* Hha 過表達造成之尿素酶活性上升。

【探討野生株與突變株之細胞黏附能力及入侵能力】(圖二十)

人體對於泌尿道感染的一道重要防線為緊密相連、排列的上皮細胞，遍布於尿道、膀胱、輸尿管、腎臟等泌尿道區域。細菌感染的前 1-3 小時即可能發生入侵細胞的現象，且藉此規避宿主之免疫系統及抗菌劑[62]。欲知 *hha* 缺失是否影響 *P. mirabilis* 的細胞黏附能力和入侵能力，以 T24 膀胱上皮細胞進行細胞黏附和入侵試驗。結果顯示 *hha* 突變株之細胞入侵能力下降 (圖二十 A、B)。

【*hha* 突變株促細胞激素之 mRNA 表現量】(圖二十一)

當細胞受損時，會產生涉及免疫細胞等引起發炎的保護性反應，可以啟動細胞組織的修復，而促發炎細胞素主要是由活化的巨噬細胞並引起炎症反應而產生[63]。在革蘭氏陰性菌急性感染細胞時，能夠觸發促發炎細胞素 IL-1 β ，IL-6[64, 65]，IL-8 及 TNF- α [66]，減少細菌存活的机会。先前研究亦顯示，*hha* 會影響 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 之促細胞激素[27]，因此我們選用人類膀胱癌上皮細胞 T24 作為促發炎細胞素試驗的宿主細胞，以 RT-qPCR 利用 IL-6 及 IL-8 之 primer 來檢測 *P. mirabilis* 野生株及 *hha* 突變株感染後之促發炎細胞素是否受到影響。結果顯示，*hha* 突變株所感染 T24 膀胱上皮細胞，IL-6 及 IL-8 細胞素的 mRNA 表現量相較於野生株感染之細胞顯著上升(圖二十一)，可見 *hha* 突變株感染膀胱細胞後使部分促發炎細胞素讓宿主引起免疫反應，更有機會把細菌毒殺。

【探討野生株與突變株在壓力環境下之存活率】(圖二十二)

當身體受細菌感染時會啟動先天免疫，將單核細胞召集至膀胱將其分化為巨噬細胞，並對其進行吞噬作用，這時細菌將面臨巨噬細胞內的酸性環境，因此於壓力抗性之發展是細菌維持生存上重要的一環，因此接下來我們將探討 *hha* 之缺失是否影響 *P. mirabilis* 之抗酸能力。結果顯示 *hha* 突變株之抗酸能力(圖二十二 A)較野生株顯著下降。*hha* 的單獨過表達株抗酸能力對比野生株有下降趨勢，而當補入過表達 *tomB* 的 plasmid 時，無法恢復 *hha* 單獨過表達株的抗酸能力(圖二十二 B)。

【探討野生株與突變株之巨噬細胞內存活能力】(圖二十三)

為觀察細菌面臨巨噬細胞之真實情況，我們將 THP-1 巨噬細胞分化後檢測 *hha* 是否影響 *P. mirabilis* 在巨噬細胞內的生存能力。結果顯示 *hha* 突變株之

巨噬細胞內存活率相較於野生株顯著下降(圖二十三)。



【探討 *hha* 對 persistence 的影響】(圖二十四)

Persister cell 是細菌的一小部分，在沒有基因改變的情況下表現出對抗生素的抗藥性[59]。TA 系統也與 persister cell 有關[60, 61]。尤其是 *E. coli* 的 MqsR/MqsA 對 persister cell 有最顯著的影響[61]。另外，RelE/RelB 中的 RelE 毒素已經被指出與 persister cell formation 相關[60]。由於有文獻指出毒素 Hha 控制細胞死亡和生物膜分散 [44]，又有文獻指出 *E. coli* Hha 影響 persister cell formation [30]。因此我們通過在 *hha* 突變株進行 persister cell formation assay，探索了 Hha 對 persister cell formation 的影響。結果顯示 *hha* 突變株對比野生株之 persister cell formation 顯著下降(圖二十四)。

【*P. mirabilis* 之運動性受 Hha dose-effect 的影響】(圖二十五)

因為發現 *hha mutant* 與 *hha* 的單獨過表達株之運動性對比野生株有下降趨勢，代表 *P. mirabilis* 之運動性受 Hha dose-effect 的影響。所以，我們利用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，觀察不同 arabinose 濃度下 Hha dose-effect 表達株之泳動能力。我們發現由 0.1% arabinose 誘導出來的 Hha dose-effect 表達株泳動能力與野生株最為相近，並可觀察到添加 0.2% arabinose 的 Hha dose-effect 表達株泳動能力更差(圖二十五)。

【*P. mirabilis* 之生物膜形成能力受 Hha dose-effect 的影響】(圖二十六)

因為發現 *hha mutant* 與 *hha* 的單獨過表達株之生物膜形成能力對比野生株有下降趨勢，代表 *P. mirabilis* 之生物膜形成能力受 Hha dose-effect 的影響。所以，我們利用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，觀察不同 arabinose 濃度下 Hha dose-effect 表達株之生物膜形成能

力。我們發現由 0.015% arabinose 誘導出來的 Hha dose-effect 表達株生物膜形成能力與野生株最為相近，並可觀察到添加 0.1% arabinose 的 Hha dose-effect 表達株生物膜形成能力更差(圖二十六)。



【*P. mirabilis* 之抗酸能力受 Hha dose-effect 的影響】(圖二十七)

因為發現 *hha mutant* 與 *hha* 的單獨過表達株之抗酸能力對比野生株有下降趨勢，代表 *P. mirabilis* 之抗酸能力受 Hha dose-effect 的影響。所以，我們利用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，觀察不同 arabinose 濃度下 Hha dose-effect 表達株之抗酸能力。我們發現由 0.015% arabinose 誘導出來的 Hha dose-effect 表達株抗酸能力與野生株最為相近，並可觀察到添加 0.5% arabinose 的 Hha dose-effect 表達株抗酸能力更差(圖二十七)。

【arabinose(0.1~0.5%)不影響帶 vector control 的 *hha* 突變株的生長】(圖二十八)

因為發現 *hha* 對致病因子的表達有 dose effect 的現象。我們觀察帶 vector control 的 *hha* 突變株在 0.1~0.5% arabinose 濃度下的生長狀況，結果顯示帶 vector control 的 *hha* 突變株的生長曲線在 0.1~0.5% arabinose 濃度下相較於在 0% arabinose 濃度下並無顯著差異 (圖二十八)，證明上述實驗中之差異並非因 arabinose 濃度所導致。

【探討野生株、突變株、互補株與過度表現株於 *Galleria mellonella* 幼蟲的毒力】(圖二十九)

綜上可知 *hha* 突變株與過度表現株於 LB broth 中多項毒力因子顯著降低，其中過度表現株的尿素酶活性增加，而為瞭解 *hha* 突變株與過度表現株之真實毒力，本篇以 *Galleria mellonella* 幼蟲模型分析 *hha* 突變株與過度表現株對於 *P.*

mirabilis 的毒力的影響。我們分別將野生株、*hha* 突變株及過度表現株接種至 *Galleria mellonella* 幼蟲，結果顯示，*hha* 突變株無論注入 100 CFU (圖二十九 A) 或 1000 CFU (圖二十九 B)，其毒力相比野生株的毒力顯著降低，互補株恢復了 *hha* 突變株之表現型；而過度表現株無論注入 100 CFU (圖二十九 A) 或 1000 CFU (圖二十九 B)，其毒力相比野生株的毒力無顯著差異。我們推測其原因為 *in vivo* 中有其他因子決定於 *Galleria mellonella* 幼蟲的毒力，而 *hha* 突變株較容易刺激細胞激素分泌，因此受免疫系統清除機率較高亦可能為毒力下降的原因之一。

第五節 Hha 與 TomB 之交互作用

【表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致生長情況較差與 conserved 的 cysteine C13 有關】(圖三十)

前面提到 Hha 充當毒素，共同轉錄的 TomB 可減弱 Hha 毒性。而有文獻指出 TomB 對 Hha 的 antitoxin 活性與 conserved C13 有關。C13E 大大降低了毒性而[C13I]Hha 保留了其充當毒素的能力[45]。因此將 *hha* C13 進行 site-direct mutagenesis 來探討 C13 突變為 isoleucine (I) 或 glutamate (E) 對 TomB-Hha 交互作用的影響。我們通過將 cysteine 突變為 glutamate 模擬在 cysteine 位置添加負電荷的效果，並測量了 [C13E]Hha 的單獨過表達株的生長情況。作為對照，我們使用野生 Hha 單獨過表達株和對生長沒有明顯影響的 [C13E]Hha 的單獨過表達株。首先看細菌的生長情況，結果顯示，野生 Hha 單獨過表達株具有毒性作用，導致生長情況較差，*tomB* 的共表達完全恢復了生長情況。雖然[C13I]Hha 的單獨過表達株保留了其作為毒素的能力，但 C13E 單獨過表達株大大降低了 Hha 的毒性。而當補入過表達 *tomB* 的 plasmid 時，無法恢復[C13I]Hha 單獨過表達株的生長情況(圖三十)。代表 C13 是重要的 residue。

【表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致泳動能力(swimming)較差與 conserved 的 C13 有關】(圖三十一)

我們接著探討當他們沒辦法交互作用時細菌的泳動能力是否會受到影響。結果顯示，和 *hha* 的單獨過表達株相同，[C13I]*hha* 的單獨過表達株會導致泳動能力較差，而[C13E]*hha* 的單獨過表達株的泳動能力相較於野生株並無顯著差異。*tomB* 與 野生 *hha* 的共表達完全恢復了 *hha* 單獨過表達株的泳動能力，而當補入過表達 *tomB* 的 plasmid 時，無法恢復[C13I]*Hha* 單獨過表達株的泳動能力(圖三十一)。代表 *tomB* 與 *hha* 的共表達完全恢復了 *hha* 單獨過表達株的泳動能力與 conserved 的 C13 有關。

【表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致生物膜形成能力較差與 conserved 的 C13 有關】(圖三十二)

我們接著探討當他們沒辦法交互作用時細菌的生物膜形成能力是否會受到影響。結果顯示，和 *hha* 的單獨過表達株相同，[C13I]*hha* 的單獨過表達株會導致生物膜形成能力較差，而[C13E]*hha* 的單獨過表達株的生物膜形成能力相較於野生株並無顯著差異。*tomB* 與野生 *hha* 的共表達完全恢復了 *hha* 單獨過表達株的生物膜形成能力，而當補入過表達 *tomB* 的 plasmid 時，無法恢復[C13I]*Hha* 單獨過表達株的生物膜形成能力(圖三十二)。代表 *tomB* 與 *hha* 的共表達完全恢復了 *hha* 單獨過表達株的生物膜形成能力與 conserved 的 C13 有關。

第六節 *hha* 之表現型相關基因調控機制

【Hha-TomB 之 auto-regulation】(圖三十三)

Hha-TomB TA 系統於 Proteobacteria 間具高度保留性，據研究報導 *hha* 與上游基因 *tomB* 組成一個 operon。確認兩者為同一 operon(圖四)後，又由於有研究報導 typeII TA system 具自我調控機制[22]。而有研究報導在 *S. Typhimurium*

將 Hha-TomB TA system 定義為第 II 型 TA 系統[43]。我們檢測 *tomB* 在 *hha* 突變株、*hhatomB* 突變株與野生株中之 promoter 活性，探討 Hha-TomB 是否存在 auto-regulation。結果顯示 *hha* 與 *hhatomB* mutant *tomB* promoter 活性上升(圖三十三)。

【*hha* 突變株之 *spoT*、*relA* 與 *rpoS* promoter 活性較野生株顯著下降】(圖三十四)

RelA 與 SpoT 為幫助細菌抗壓之蛋白，當細菌面臨酸性與營養缺乏環境壓力時，RelA 與 SpoT 會促進 ppGpp 生成使菌體進入代謝停止期，幫助細菌度過難關，直到壓力解除，SpoT 再水解 ppGpp 使其恢復生長代謝功能[67, 68]。此外 RpoS 為細菌 general stress regulator 負責幫助細菌對抗環境壓力[69]。其中細菌的抗酸系統 AR1 為 Crp 與 RpoS 調控之系統。因此我們想了解 Hha 相關壓力保護作用是否和 RelA、SpoT 與 RpoS 有關。結果顯示 *hha* 突變株之 *spoT*、*relA* 與 *rpoS* promoter 活性皆較野生株顯著下降(圖三十四 A、B、C)。

【CueR 調控 *hha* 之基因表現】(圖三十五)

我們經由 blast 方法找到 *P. mirabilis* 之 *hha* promoter 中存在著與 *E. coli* K12 及 *Salmonella* Typhimurium 之 CueR binding site 相似的序列[70, 71]，故推測在有銅環境下 *P. mirabilis* 中 CueR 亦會調控 *hha* 的基因表達。位於細胞質中的 CueR 屬於 MerR 蛋白家族，該家族轉錄因子可通過直接結合相應配體，從而使其相應調控之基因啟動 DNA 結構轉為活性構象，進而促進該基因之表達。CueR 是由兩個同源單體組成的同源二聚體，其中每個單體都由帶有兩個 helix-turn-helix motifs 的 N 端 DNA-binding domain、中心的二聚結構區域(central dimerization domain)及 C 端金屬結合區域所組成。CueR 的金屬結合區域中的兩個銅結合半胱氨酸(copper-binding cysteine)在 CueR 與單價銅離子的共價結合中扮演著重要

角色[72]，金屬離子會以線性配位鍵(linear coordination)的方式鍵合至這兩個半胱氨酸上，而 CueR 上的二硫醇鹽配位鍵(dithiolate coordination)賦予蛋白對正一價金屬離子的選擇性[73]。因此我們為證實 CueR 會調控 *hha*，我們將含有 *hha* promoter 之 reporter plasmids 送入野生株及 *cueR* 突變株中，並測試其在 LB 中的 promoter 活性。結果表明，於 *cueR* 突變株而言，其 *hha* promoter 活性較野生株顯著下降(圖三十五)，此結果印證了 *P.mirabilis* 可通過 CueR 正向調控 *hha* promoter 之基因表現量。

【CueR 調控 *hha* 的表現】(圖三十六)

由於發現 N_2 *hha* 上游有可能的 CueR binding site，且由 reporter assay 的結果可發現於 *cueR* 突變株而言，其 *hha* promoter 活性較野生株顯著下降；因此懷疑 CueR 是透過結合至 *hha* 的 promoter 序列，進而調控 *hha* 的表現而導致 reporter assay 實驗觀察到基因表現的減少，因此利用 EMSA (electrophoretic mobility shift assay)來證明 CueR 是否會直接調控 *hha* 表現。首先將純化後的 CueR 蛋白與 0.1 μ g 的 promoter DNA 序列在適當的 binding buffer 中於室溫反應 30 分鐘，再以 5 % TAE PAGE 分析，最後以 EtBr 染色觀察 DNA 是否發生位移。由實驗的結果發現，當 CueR 蛋白濃度為 2 μ M 的時候可以發現膠圖上方開始有 shift band 產生，當 CueR 蛋白濃度增加時，DNA 片段量則明顯更少 (圖三十六，lane. 1-4)。如果使用另一段的 DNA 序列(negative control)，則相同濃度的 CueR 蛋白皆無位移的 band 產生(圖三十六，lane. 5-7)。由此實驗結果可證明上述，CueR 可直接結合至 *hha* promoter 進而調控 *hha* 的表現。

【CpxR 正向調控 *hha* 之基因表現量】(圖三十七)

同時我們亦利用 softberry 網站預測到 *P. mirabilis* 的 locus 上 *hha* 基因前有 CpxR binding site。Cpx pathway 是一個廣泛被研究的 two component system

(TCS)，由 CpxA (HK)接收外界訊息後，藉由磷酸根活化將訊息傳給 CpxR (RR)，磷酸化的 CpxR-P 則會和下游基因結合進而調控基因表現[74]。Cpx TCS 在腸內菌屬中為很常見的系統，由於細菌生長會遇到很多生存壓力，研究報導當 *cpxA* 接收到特定訊息 (如：鹼性環境、銅離子濃度改變、過多的外膜脂蛋白 NlpE[75]、不正確摺疊結構的蛋白等)時會活化 *cpxR*，使其下游的基因被調控，進而減緩細胞 envelope 上的壓力，根據文獻報導 NlpE 會因為 Cu、ROS 及 adhesion 而活化 Cpx，是因為上述的壓力會使 NlpE 的一些結構鍵結的改變而與 CpxA 交互作用[76]。在壓力存在的環境下 *E. coli* 的 CpxTCS 調控超過 100 個蛋白[77] 的表現，已知其會調控與雙硫鍵合成相關的 DsbA、蛋白分解酶 DegP、與壓力反應有關的 RpoE 等，Cpx TCS 扮演維持細胞外膜穩定性的角色，主要功能在於維持表面結構如纖毛的表現或是細菌黏附在表面的偵測[78]，最早發現受 Cpx TCS 調控的基因為 *htrA*、*dsbA* 與 *ppiA*，這些蛋白參與細胞間質的蛋白質摺疊與分解[79]，接著研究陸續發現 Cpx pathway 活化後會影響細菌如：*E. coli* 的 swarming、biofilm[80] 的生成能力等毒力因子的表現而影響其致病力。因此我們為證實 CpxR 會調控 *hha*，我們將含有 *hha* promoter 之 reporter plasmids 送入野生株及 *cpxR* 突變株中，並測試其在 LB 中的 promoter 活性。結果表明，於 *cpxR* 突變株而言，其 *hha* promoter 活性較野生株顯著下降(圖三十七)，此結果印證了 *P.mirabilis* 可通過 CpxR 正向調控 *hha* promoter 之基因表現量。

【*hha* 突變株在高銅濃度環境下菌體內堆積銅離子較野生株高】(表一)

為證實 Hha 可以幫助 *P. mirabilis* 維持菌體中銅濃度之恆定，本篇利用 ICP-MS 的方法來分析在高銅濃度環境下野生株及 *hha* 突變株菌體銅濃度之變化，在 2 mM 銅濃度環境下 *hha* 突變株與野生株的菌體內銅濃度沒有統計差異(表一)。

【*hha* 突變株及野生株的膜蛋白分析】(圖三十八)

我們推測 *hha* 突變可能造成 envelope protein 改變而影響對銅感受性[52]，於是我們分析內膜及外膜蛋白之變化。因此我們萃取野生株及 *hha* 突變株的生長 18 小時的內膜及外膜蛋白，利用 SDS-PAGE 進行蛋白質電泳分析比較在兩者定量後蛋白 pattern 有否差異，結果顯示 *hha* 缺失後並未發現有任何內膜或外膜蛋白含量產生差異(圖三十八)，推測 *hha* 缺失應該沒有影響 *P. mirabilis* 的內膜或外膜蛋白。但實驗室使用一維電泳，可能有 sensitivity 不夠的疑慮。

【銅或尿素（高滲透壓）會誘導 *hha* 表現】(圖三十九)

因為我們以含 3.25 mM CuCl₂ 的 LSW plate 來篩選出銅感受性較高的本篇突變株 *hha*，推測銅調控 *hha* 之基因表現量，qPCR 結果表明 *P. mirabilis* 中 *hha* 的基因表現量於 50 μM Cu 環境下顯著上升(圖三十九 A)。而因為 *hha* 突變株之尿素酶活性較野生株顯著下降，推測尿素調控 *hha* 之基因表現量，qPCR 結果表明 *P. mirabilis* 中 *hha* 的基因表現量於 0.5 M 尿素環境下顯著上升(圖三十九 B)。最後我們發現銅或尿素（高滲透壓）皆會誘導 *hha* 表現。

第四章 結論與討論



第一節 結論

以 transposon mutagenesis 的方式構建突變菌株，並篩選到對銅具有高感受性之突變株，在經過基因分析後得到 *hha* 突變株。同時利用 NCBI Blast 對 *E. coli*、*Salmonella* Typhimurium 及 *P. mirabilis* 中 Hha 之胺基酸序列進行分析，結果顯示 *P. mirabilis* (Pm str. N₂) 中 Hha 胺基酸序列與 *E. coli* K12 和 *Salmonella* Typhimurium (LT2) 相比有著約 97% 的相似度，作為毒素，與 antitoxin TomB 構成第七型 TA 系統。

我們的研究結果表明，Hha 過表達對 *P. mirabilis* 菌體有毒性，TomB 的表達則可保護菌體。

為探討 *hha* 突變株對銅產生高感受性的機制，首先確認了 *hha* 突變株在何種銅濃度的環境下生長較差，結果表明 *hha* 突變株在含 100 μ M 銅以上的 GM broth 相比野生株生長情況較差，為提供一個與人體環境相似的環境，故接著測試分別在有氧條件和厭氧條件下對銅的感受性，發現不管有氧或厭氧下 *hha* 突變株的存活率對比野生株有下降趨勢，而厭氧環境下 *hha* 突變株對銅更敏感，表示在人體環境對銅更敏感，其中 Hha 扮演某個角色。

接著探討 *hha* 突變株對 *P. mirabilis* 致病因子的影響，表面移行、泳動能力、urease 活性、細胞黏附率、細胞入侵率、生物膜生成量、不同壓力 (acid、抗生素) 下存活率皆顯著下降，此外 in vivo 試驗也發現對蠟蛾的毒力顯著下降。同時我們發現 *hha* 對致病因子的表達有 dose effect 的現象。

有關 *hha* 突變株泳動能力以及表面移行下降，我們觀察到鞭毛的生成減少、菌體的分化能力下降。經由 reporter assay 可知 *hha* 突變株相較於野生株 *flhDC* 的 promoter 活性顯著下降，*flhDC* 為鞭毛合成之 master operon。*hha* 突變株生物膜形成下降可能與 eDNA 分泌減少、*pmpA* 及 *mrp* 表現下降有關。於壓力抗性

方面，觀察到 *hha* 突變株會使 *spoT*、*relA* 及 *rpoS* 等壓力相關基因表現減少，推測此為 *hha* 突變株對惡劣環境適應力差的原因之一。

Hha 充當毒素時，共同轉錄的 TomB 可減弱 Hha 毒性。經由 site-direct mutagenesis 可知 C13 是重要的 residue。此外，Hha-TomB 具自我調控機制。CueR、CpxR 調控 *hha* 表現; Hha 調控 *rpoE*、*rcsB*、*cueR* 表現，而銅會誘導 *hha* 表現。

從以上得知，*P. mirabilis* Hha 在銅恆定以及毒力因子表現中均扮演著重要角色。

第二節 討論

【Hha 影響表現型及毒力因子】

為了解 Hha 在 *P. mirabilis* 會影響何種致病因子，針對 *hha* 突變株的致病因子，我們當中測試的結果顯示運動性顯著下降、生物膜形成顯著下降、urease 顯著下降，以及在壓力環境下的存活顯著下降，例如抗生素下 persistent cells 形成，以及蠟蛾體內毒力試驗顯示 *hha* 缺失使毒力下降。首先我們推測 Hha 之所以影響生物膜形成，其中一個原因是 *hha* 突變株之 *pmpA* promoter 活性下降，導致 Pmp 菌毛(fimbriae) 生成量下降，纖毛能直接影響生物膜形成[81]。我們觀察到培養至第 3、5、7 小時時 *hha* 突變株對比野生株之 *pmpA* promoter 活性都下降，但培養至第 24 小時時 *hha* 突變株對比野生株之 *pmpA* promoter 活性無顯著差異。我們推測其原因可能為 Hha 正調控 *pmpA* 的表現受 time-course 影響。另外，*P. mirabilis* 的 MR/P fimbriae 表現受其 promoter 方向決定，我們發現 *hha* mutant 中 phase ON 變少了。影響生物膜形成之因子有很多，例如 eDNA、EPS、autoaggregation，故本篇亦對這些物質進行分析。結果顯示，*hha* 突變株中 eDNA 分泌顯著下降，但 EPS 以及 autoaggregation 能力則與野生株無顯著差異 (data not shown)。因為發現 *hha* mutant 與 *hha* 的單獨過表達株之運動性、生物膜形成及抗酸能力對比野生株有下降趨勢，代表 *P. mirabilis* 之運動性、生物膜形成及抗酸能力受 Hha dose-effect 的影響。但是 *hha* 的單獨過表達導致尿素酶活性對比野生株有上升趨勢。我們推測其原因可能為 Hha:TomB 比率還未高到會使 HhaTomB 複合物從操縱子 DNA 中釋放。另外，表現 *tomB* 完全恢復了 *hha* 的過表達導致的運動性較差及生物膜形成能力較差，代表 TomB 會緩解 *P. mirabilis* Hha 過表達造成之運動性及生物膜形成能力缺失。而 *hha* 的單獨過表達株抗酸能力對比野生株有下降趨勢，但是當補入過表達 *tomB* 的 plasmid 時，無法恢復 *hha* 單獨過表達株的抗酸能力。我們推測其原因為 Hha:TomB 比率可能不是 *P. mirabilis* Hha-TomB 蛋白結合至抗酸相關 promoter

DNA 的決定因子。對於 *hha* 突變株蠟蛾體內毒力顯著下降的原因，我們認為是細菌的運動能力下降導致細胞黏附率及細胞入侵率下降所引致的，由於 *hha* 突變株在表面上的運動能力及泳動能力減慢，讓細菌比起野生株更難靠近細胞，使細胞黏附及入侵能力下降，而 *hha* 突變株較容易刺激細胞激素分泌，因此受免疫系統清除機率較高亦可能為毒力下降的原因之一。此外 *in vivo* urease 活性下降也會影響生物膜形成。為了解 Hha 過度表現(overexpression)株在 *P. mirabilis* 會影響何種致病因子，針對 Hha 過度表現(overexpression)株的致病因子，我們當中測試的結果顯示運動能力顯著下降、生物膜生成量顯著下降，不過 *Galleria mellonella* 幼蟲毒力無顯著差異，我們推測其原因為 *in vivo* 中有其他因子決定於 *Galleria mellonella* 幼蟲的毒力。另外也有文獻報導，Hha 通過與細菌細胞中 *flhDC* 和 *csgDEFG* promoter 區域的直接作用來調節 *flhD* 和 *csgD* 表達，進而來調節 EHEC O157:H7 中生物膜的形成[29]。本研究，我們發現 Hha 也會調控鞭毛及 fimbriae 表現。因此未來我們將進行 EMSA 實驗，證明 *P. mirabilis* 的 Hha 蛋白是否具有結合 *flhDC*、*pmpA* promoter DNA 之能力。

【Hha 於 *P. mirabilis* 之調控機制】

我們實驗室挑出在 *P. mirabilis* 中與抗銅相關的 *hha* 基因，透過實驗也證明突變株在有銅環境下生長比野生株差。我們以 reporter assay 偵測 *hha* 突變株之 *rpoE*、*rpsB* 與 *cueR* promoter 活性較野生株顯著下降，*rpoE*、*rpsB* 與 *cueR* 已被報導和抗銅相關[46-51]。由 EMSA 實驗結果證明，CueR 可直接結合至 *hha* promoter 進而調控 *hha* 的表現。目前尚未清楚 *hha* 突變株的抗銅原因，我們以 qPCR 方式偵測 *P. mirabilis* 中 *hha* 的基因表現量於 50 μ M Cu 環境下顯著上升，日後探討要以 RT-qPCR 方式偵測 *hha* 突變株之以上四個基因 *cpxR*、*cueR*、*rpoE* 及 *rpsB* 之 mRNA 表現量，證實其調節壓力的訊息傳遞。找到相關 regulator，再進行 *hha* 突變株與 *hha* 過表達株的 transcriptome 分析尋找該 regulator 之抗銅基

因。在 *P. mirabilis*，CpxR [82]、RpoE [53] 及 RcsB[54]皆參與維持外膜穩定及對抗抗生素的能力[83-85]。我們推測 *hha* 突變可能造成 envelope protein 改變而影響對銅感受性[52, 86, 87]，但是我們的結果顯示 *hha* 缺失後並未發現有任何內膜或外膜蛋白含量產生改變。但實驗室使用一維電泳，可能有 sensitivity 不夠的疑慮。我們認為 *hha* 突變株對銅、部分抗生素的感受性可能與 *P. mirabilis* 這些調節壓力反應的系統相關。透過實驗證明 Hha-TomB TA system 存在 auto-regulation。因為我們利用 Softberry 網站預測 Hha-TomB TA system 的 promoter，結果顯示有兩個 promoter。若未來想要研究在不同環境下，決定 Hha 基因 mRNA 合成的 promoter 為何者則需要後續進行 5' rapid amplification of cDNA ends(5' RACE) 實驗驗證。據文獻報導，抗毒素通常會結合至啟動子以抑制 TA system 的轉錄，在大多數描述的情況下具有低親和力。通過與其同源毒素形成複合物可以增強這種親和力。超過一定的毒素/抗毒素比例將導致無法與其 promoter 結合[22]。*E. coli* 的 *relBE* locus encodes mRNA interferase RelE，切割位於核糖體的 mRNA。RelB 抗毒素與 RelE 結合中和其 mRNA 裂解活性。RelB 與 *relBE* promoter region 結合 autoregulates *relBE* 轉錄。RelB 單獨可以抑制 *relBE* 轉錄，但 RelE 大大增強了抑制作用，然而，過量的 RelE 會使 RelB•RelE 複合物從操縱子 DNA 中釋放從而刺激 *relBE* 轉錄。因此，決定 *relBE* promoter 開/關狀態的是 RelB:RelE 比率，而不是蛋白的絕對濃度[88]。因為我們發現 *hha* 對致病因子的表達有 dose effect 的現象。因此未來我們將進行 EMSA 實驗，證明是否 Hha:TomB 比率是 *P. mirabilis* Hha-TomB 蛋白結合 DNA 的決定因子。

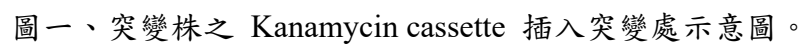
【Hha 對抗壓能力之調控】

RelA 與 SpoT 為幫助細菌抗壓之蛋白，當細菌面臨酸性與營養缺乏環境壓力時，RelA 與 SpoT 會促進 ppGpp 生成使菌體進入代謝停止期，幫助細菌度過



難關，直到壓力解除，SpoT 再水解 ppGpp 使其恢復生長代謝功能[67, 68]。此外 RpoS 為細菌 general stress regulator 負責幫助細菌對抗環境壓力[69]。其中細菌的抗酸系統 AR1 為 Crp 與 RpoS 調控之系統。據文獻報導，壓力會觸發 ppGpp 的產生，進而通過抑制 exopolyphosphatase (PPX) 觸發 inorganic polyphosphate (polyP) 的積累。而 polyP 的積累會調節 Lon protease，而 Lon protease degrade 抗毒素後將 activate toxin[20]。而經 reporter assay 分析發現 *hha* 突變株會使 *spoT*、*relA* 及 *rpoS* 等壓力相關基因表現減少，可知 Hha 正向調控壓力相關基因，推測其可能為 *hha* 突變株抗壓能力較差的原因之一。Persister cell 是細菌的一小部分，在沒有基因改變的情況下表現出對抗生素的抗藥性[59]。TA 系統也與 persister cell 有關[60, 61]。尤其是 *E. coli* 的 MqsR/MqsA 對 persister cell 有最顯著的影響[61]。另外，RelE/RelB 中的 RelE 毒素已經被指出與 persister cell formation 相關[60]。由於有文獻指出毒素 Hha 控制細胞死亡和生物膜分散 [44]，又有文獻指出 *E. coli* Hha 影響 persister cell formation [30]。因此我們通過在 *hha* 突變株進行 persister cell formation assay，探索了 Hha 對 persister cell formation 的影響。結果顯示 *hha* 突變株對比野生株之 persister cell formation 顯著下降，推測 *hha* 可能參與 persister cell formation。

The logo of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a bell and a book, surrounded by the university's name in Chinese characters: "國立台灣大學" (National Taiwan University) at the top and "愛國愛校 勵學勵教" (Love the country, love the school; encourage learning, encourage teaching) at the bottom.



(B)



定序後推斷 *hha* 中 Kanamycin cassette 之插入突變處及設計引子之示意圖。

Proteus mirabilis N₂

tomB 66/102(64%) *hha* 65/67(97%) *maa*

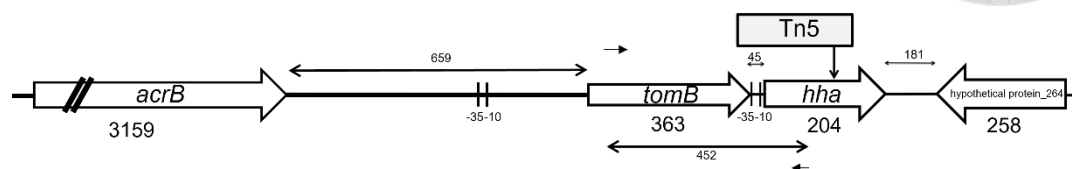
Salmonella Typhimurium LT2

tomB 66/102(64%) *hha* 65/67(97%) *maa*

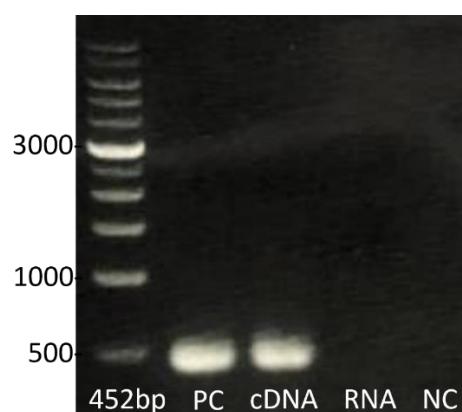
hypothetical protein_264 258bp

圖三、比對 *E. coli*、*Salmonella Typhimurium* 和 *P. mirabilis* 中 Hha 之胺基酸序列

(A)

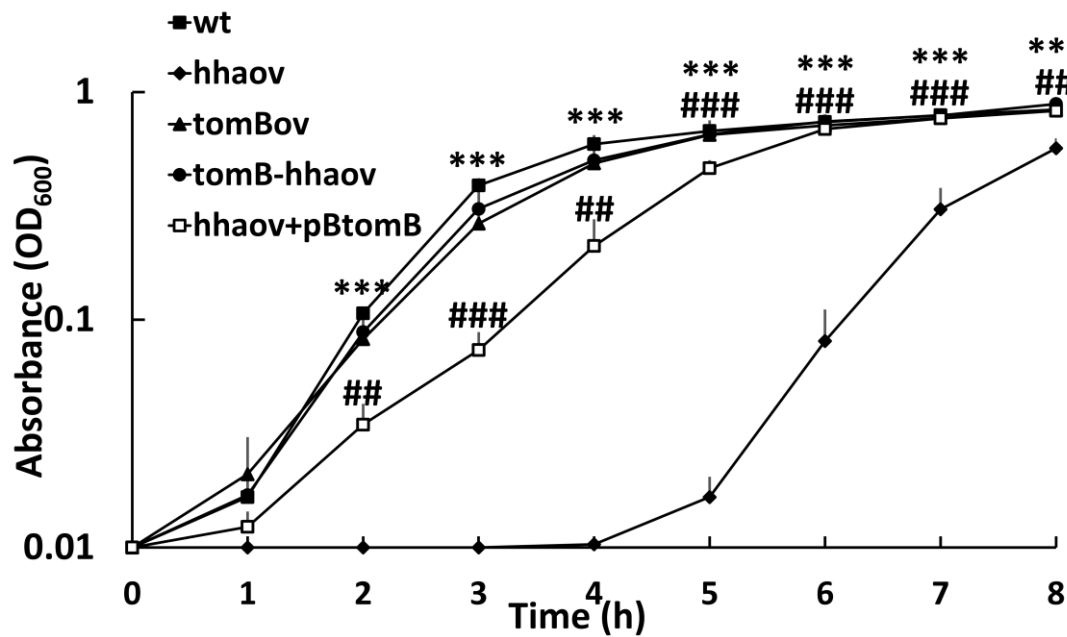


(B)



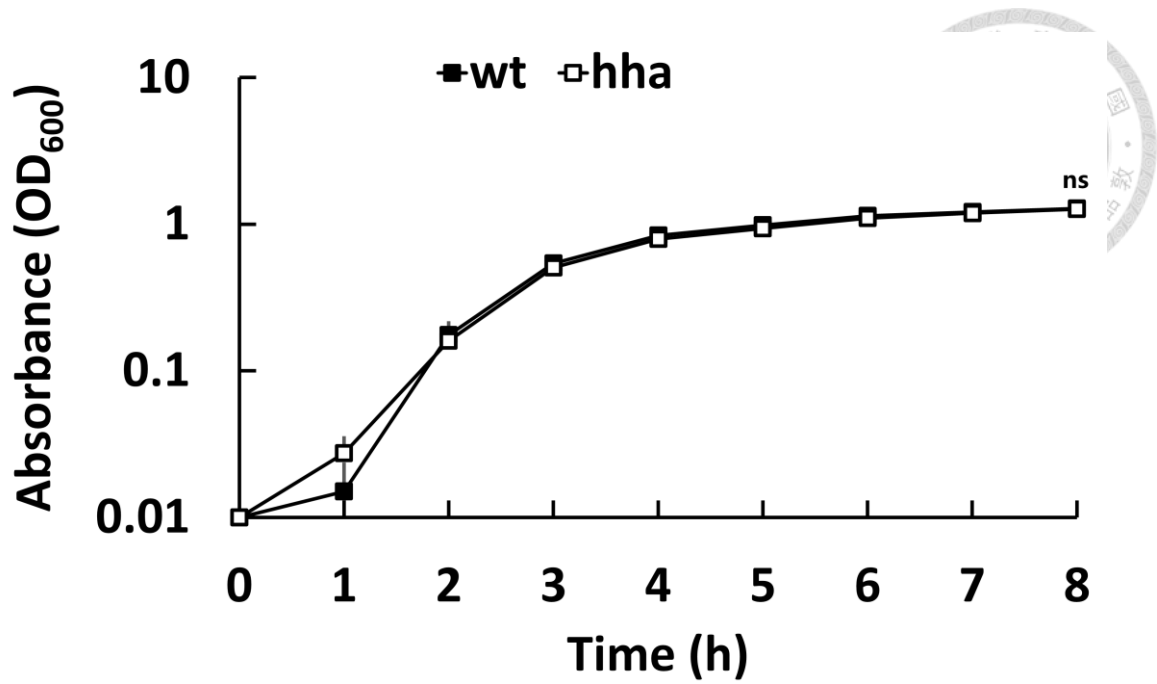
圖四、證明 *hha* 及 *tomB* 為同一 operon

(A) *P. mirabilis* Hha-TomB 基因位點。(B)證明 *hha* 及 *tomB* 為同一 operon 的膠圖：純化細菌 5 小時的 mRNA 並利用 *hha* RT-R primer 將 mRNA 反轉錄成 cDNA，再以 *tomB* RT primer 進行 PCR 得出大小為 452 bp 產物，PC:以 genome 為模板，NC:以 ddH₂O 為模板。



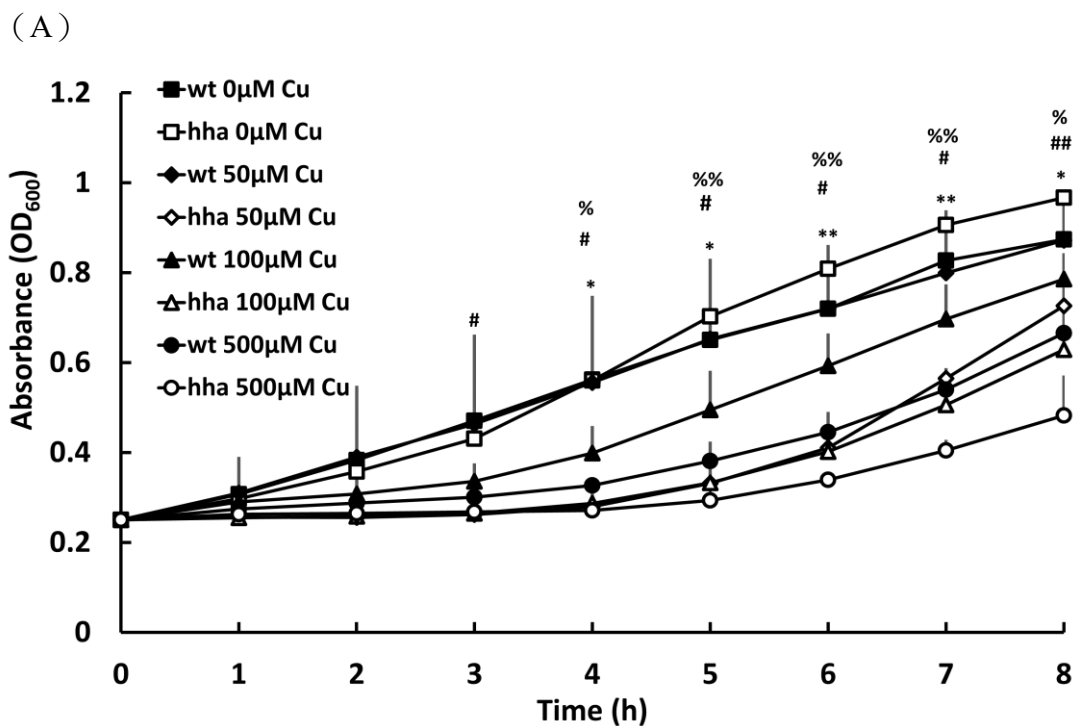
圖五、*hha* 單獨過表達株之生長顯著下降，*tomB* 的共表達完全恢復了生長情況，而 *tomB* 單獨過表達株不影響 *P. mirabilis* 生長

將 LB 隔夜培養菌液 OD₆₀₀ 調至 0.01 作為生長起始值，每小時以 OD₆₀₀ 偵測，Y 軸為對數刻度。此生長曲線使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 單獨過表達株之載體，並利用 0.015% 之 arabinose 檢測 *tomB* 單獨過表達株之生長曲線。wt 指 wt-pGEM 及 wt-pGEM-pBAD。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinose 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，**p<0.01, ***p<0.001 by Student's t test)，wt, wild type; hhaov, *hha* overexpression strain; tomBov, *tomB* overexpression strain; tomB-hhaov, *tomB-hha* overexpression strain。

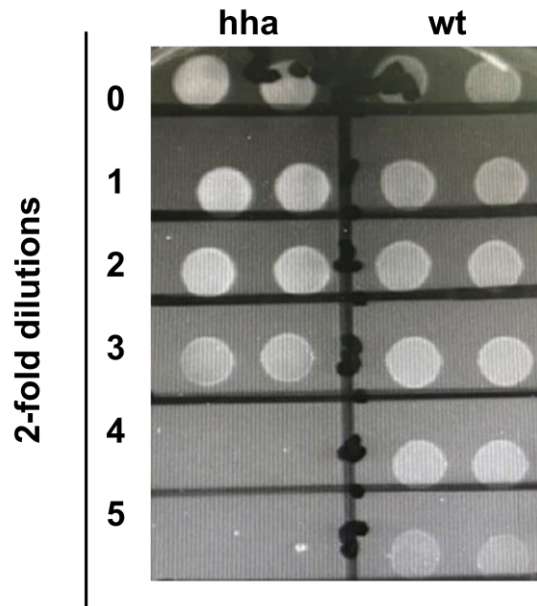


圖六、*hha* 突變株不影響 *P. mirabilis* 生長

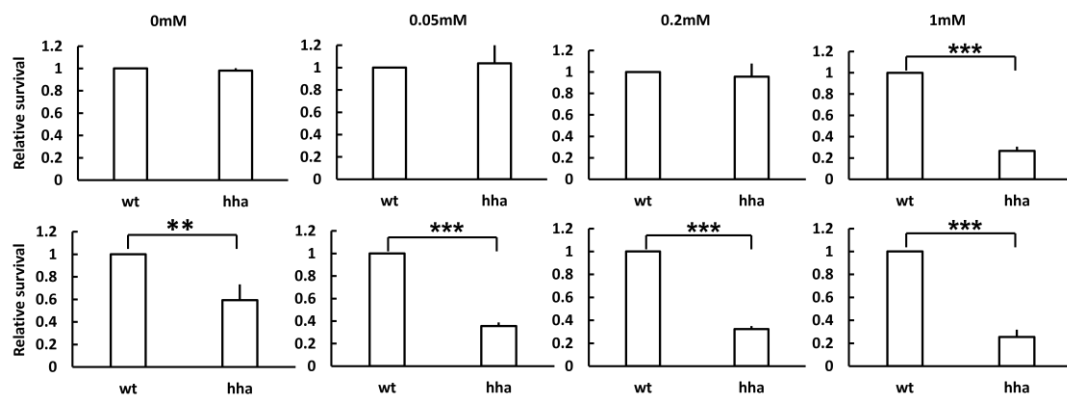
將 LB 隔夜培養菌液 OD₆₀₀ 調至 0.01 作為生長起始值，每小時以 OD₆₀₀ 偵測，Y 軸為對數刻度。此為三次獨立實驗結果（誤差線為 SD，ns: no significant difference），wt, wild type; hha, *hha* mutant。



(B)



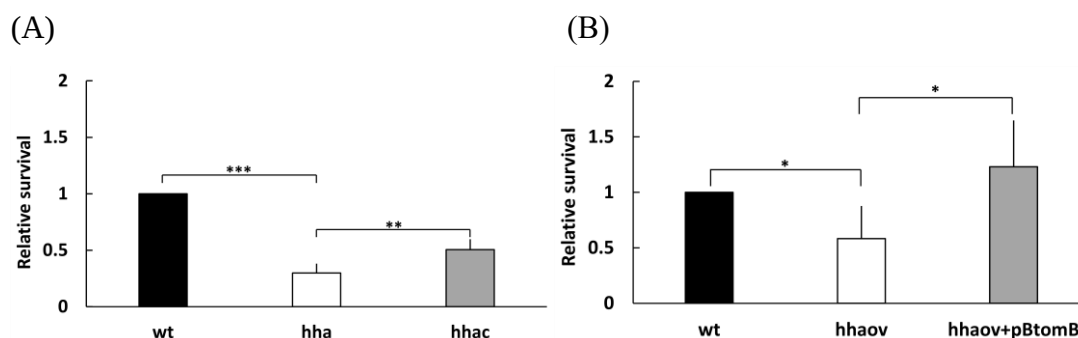
(C)



圖七、*hha* 突變株對銅之感受性

(A)以含不同銅濃度之 GM 將隔夜培養菌液 OD_{600} 調為 0.25，且每小時以 OD_{600} 偵測其生長曲線。Y 軸為對數刻度(*為 wt 50 μ M Cu 相對於 *hha* 50 μ M Cu，#為 wt 100 μ M Cu 相對於 *hha* 100 μ M Cu，%為 wt 500 μ M Cu 相對於 *hha* 500 μ M Cu)。此為三次獨立實驗結果（誤差線為 SD，** $p < 0.01$ by Student's t test），wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。(B)在 LSW plate 中加入 2.5 mM 之銅測試野生株（圖右）以及 *hha* 突變株（圖左）之生長情況，原倍菌液為 $OD_{600}=0.08$ ，經過二倍序列稀釋後以 5 μ l 點盤，隔天觀察點盤結果。wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。(C)在 LSW plate 中加入 0，0.05，0.2 及 1 mM 之銅測試

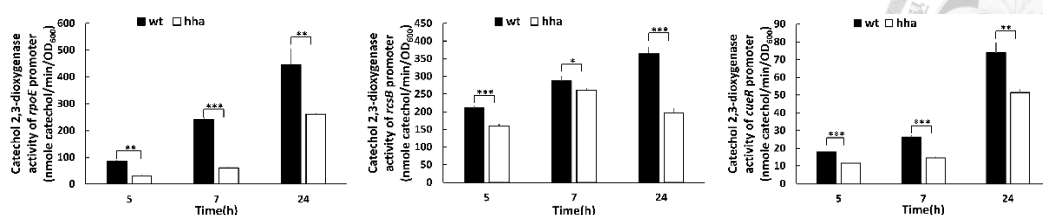
野生株以及 *hha* 突變株之生長情況，原倍菌液為 OD₆₀₀=0.5，經過十倍序列稀釋後以 5 µl 點盤，在有氧條件（頂部）和厭氧條件（底部）下生長，隔天觀察點盤結果，計算野生株以及 *hha* 突變株存活率。此為三次獨立實驗結果，wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。



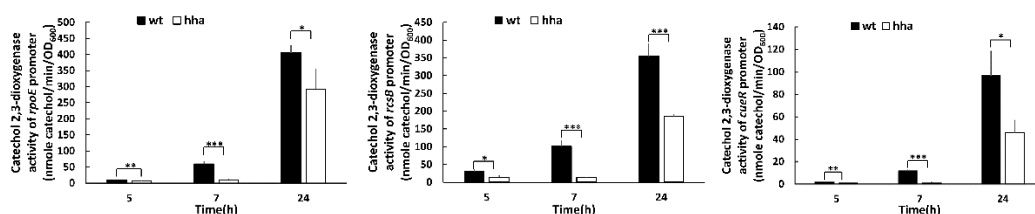
圖八、*hha* 單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株對銅之感受性

(A)在 LSW plate 中加入 1 mM 之銅測試野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)之生長情況，原倍菌液為 OD₆₀₀=0.5，經過十倍序列稀釋後以 5 µl 點盤，隔天觀察點盤結果，計算野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)存活率。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector control。互補株由 0.00015% arabinoses 誘導。(B)在 LSW plate 中加入 1 mM 之銅測試 *hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株之生長情況，原倍菌液為 OD₆₀₀=0.5，經過十倍序列稀釋後以 5 µl 點盤，隔天觀察點盤結果，計算野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株存活率。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 的共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoses 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by Student's t test)，wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。

(A)



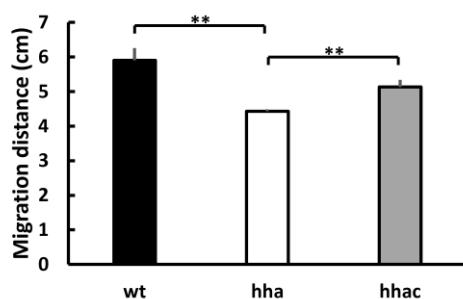
(B)



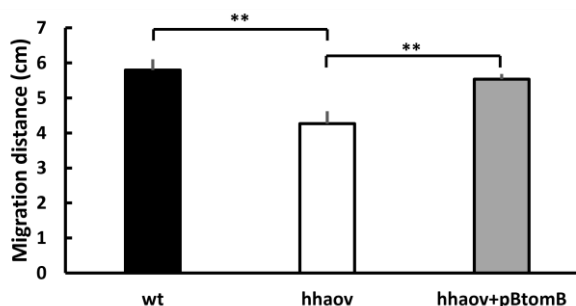
圖九、*hha* 突變株之 *rpoE*、*rcsB*、*cueR* promoter 活性較野生株顯著下降

(A)將帶有 *rpoE*、*rcsB*、*cueR* promoter plasmid 之野生株及 *hha* 突變株隔夜培養，此後以 1:100 稀釋後次培養於 LB，並培養至第 5、7、24 小時時檢測其 promoter 活性。(B)將帶有 *rpoE*、*rcsB*、*cueR* promoter plasmid 之野生株及 *hha* 突變株隔夜培養，此後以 1:100 稀釋後次培養於加入 1 mM 銅之 LB，並培養至第 5、7、24 小時時檢測其 promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by Student's t test)，wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。

(A)



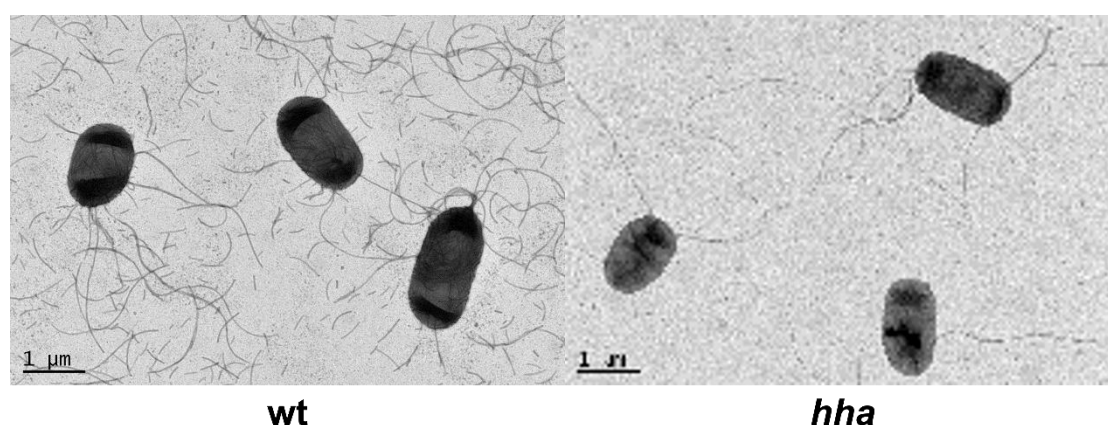
(B)



圖十、*hha* 突變株之泳動能力較野生株顯著下降

以接種針沾取隔夜菌液插入 0.3% luria agar plate 中央，於 18 小時後測量其泳動

距離。(A)此 swimming test 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector control。互補株由 0.00015% arabinoses 誘導。(B)此 swimming test 使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 的共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoses 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，** $p < 0.01$ by Student's *t* test)，wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。

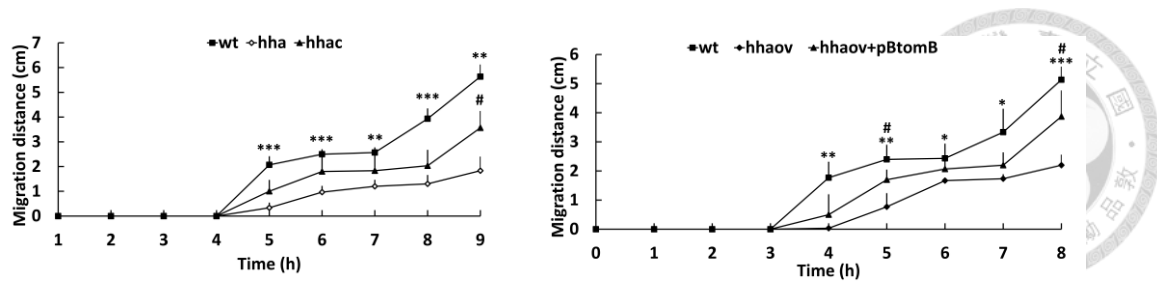


圖十一、*hha* 突變株鞭毛量顯著低於野生株

將隔夜菌液塗佈於 1.5% Luria agar plate 上培養五小時，用 PBS 清洗菌液並取 10 μ l 滴在 formvar-coated grid(Electron Microscopy Sciences)上，20 分鐘後用吸水紙將殘餘液體吸乾，在室溫下靜置 10 分鐘，此後取 10 μ l 37°C 預熱過的 1% PTA 滴在 grid 上，等待 15 秒後用吸水紙吸乾，室溫下靜置 16 小時後使用穿透式顯微鏡觀察。以上感謝第一共研冷凍電子顯微鏡核心-劉淦光老師之協助。wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。

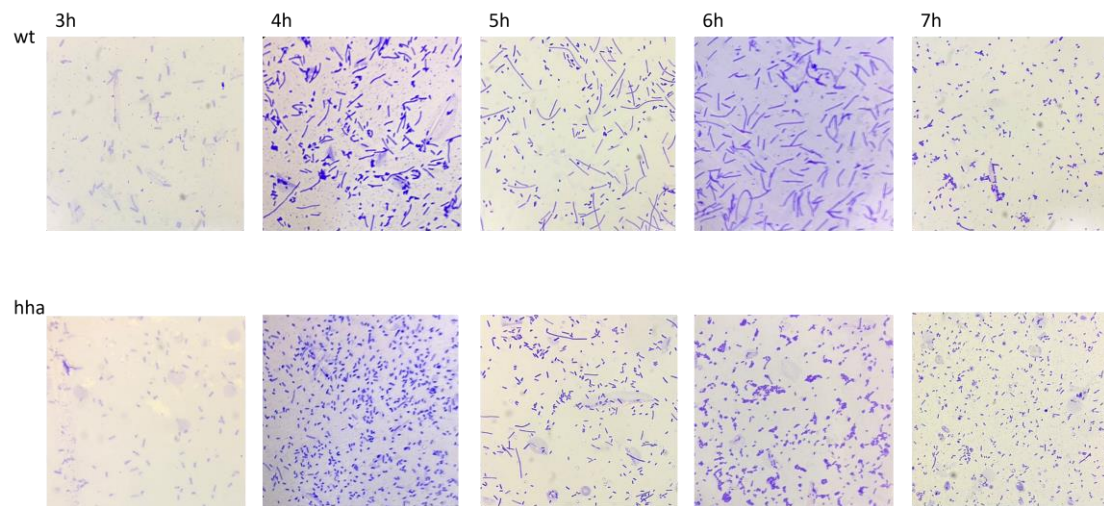
(A)

(B)



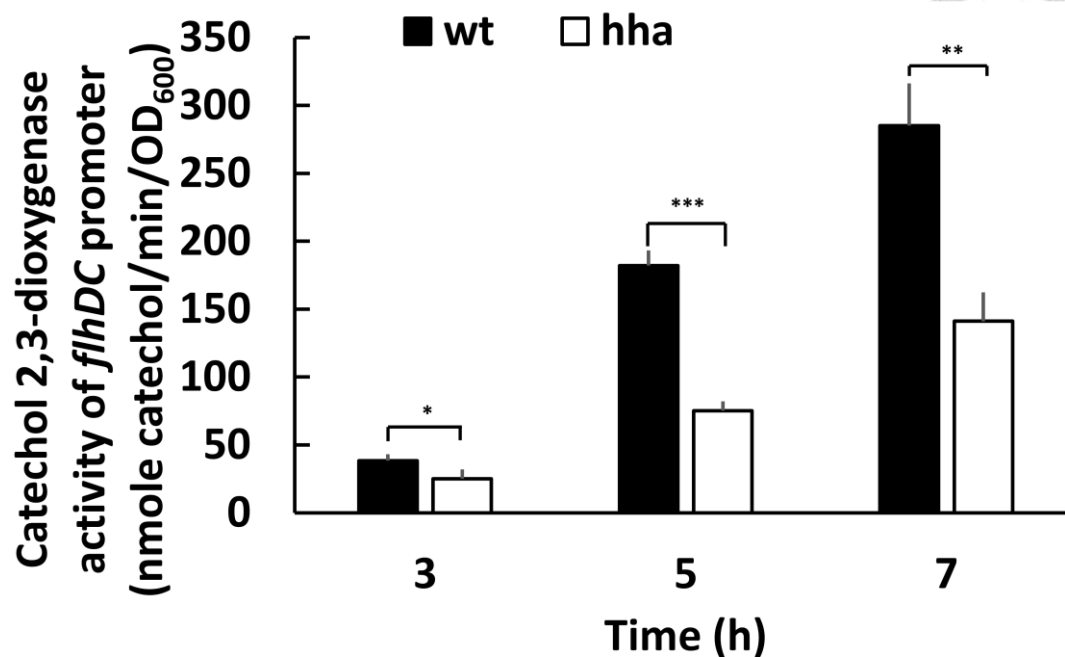
圖十二、*hha* 突變株之表面移行能力(swarming)較野生株顯著下降

取 5 μ l 隔夜菌液滴於 1.5% LB plate 中央，待其風乾後每小時測量一次細菌之爬行距離。(A)此 swarming test 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector control。互補株由 0.00015% arabinoses 誘導(*為 wt 相對於 *hha*，#為 *hhac* 相對於 *hha*)。(B) 此 swarming test 使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 的共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoses 誘導(*為 wt 相對於 *hhaov*，#為 *hhaov*+pBtomB 相對於 *hhaov*)。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ by Student's t test)，wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。



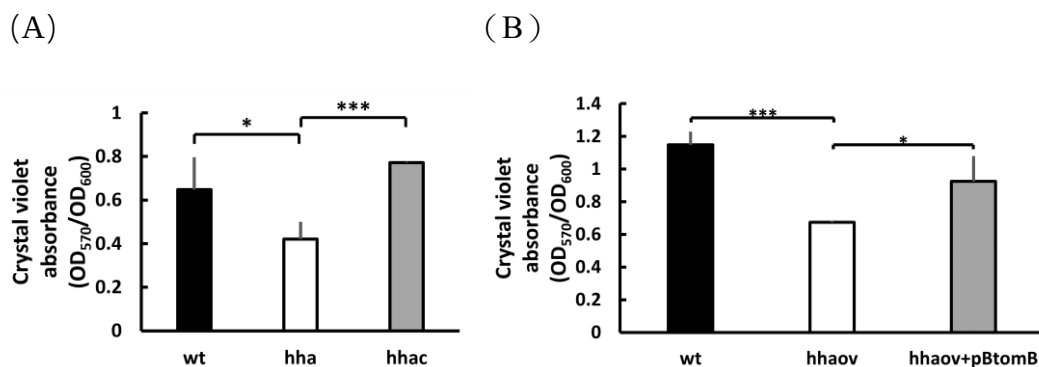
圖十三、*hha* 突變株之菌體較野生株短小

(A) 將隔夜培養菌液塗佈於 1.5% Luria agar plate 上，置於 37°C 培養至第 3、4、5、6、7 小時，在各個時間點分別取樣，並以結晶紫染色，此後以油鏡(1000 倍)觀察細胞長度並拍照。wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。



圖十四、*hha* 突變株之 *flhDC* promoter 活性較野生株顯著下降

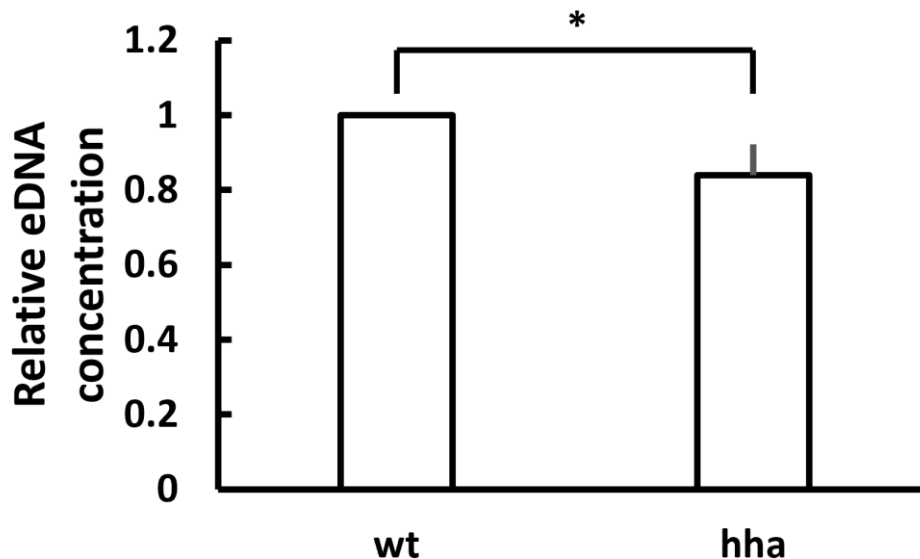
將帶有 *flhDC* promoter plasmid 的野生株及突變株之隔夜菌液取 100 μ l 菌液均勻塗布在 1.5% Luria agar plate 上，培養至第 3、5、7 小時時檢測其 *flhDC* promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant。



圖十五、*hha* 突變株之生物膜形成能力顯著下降

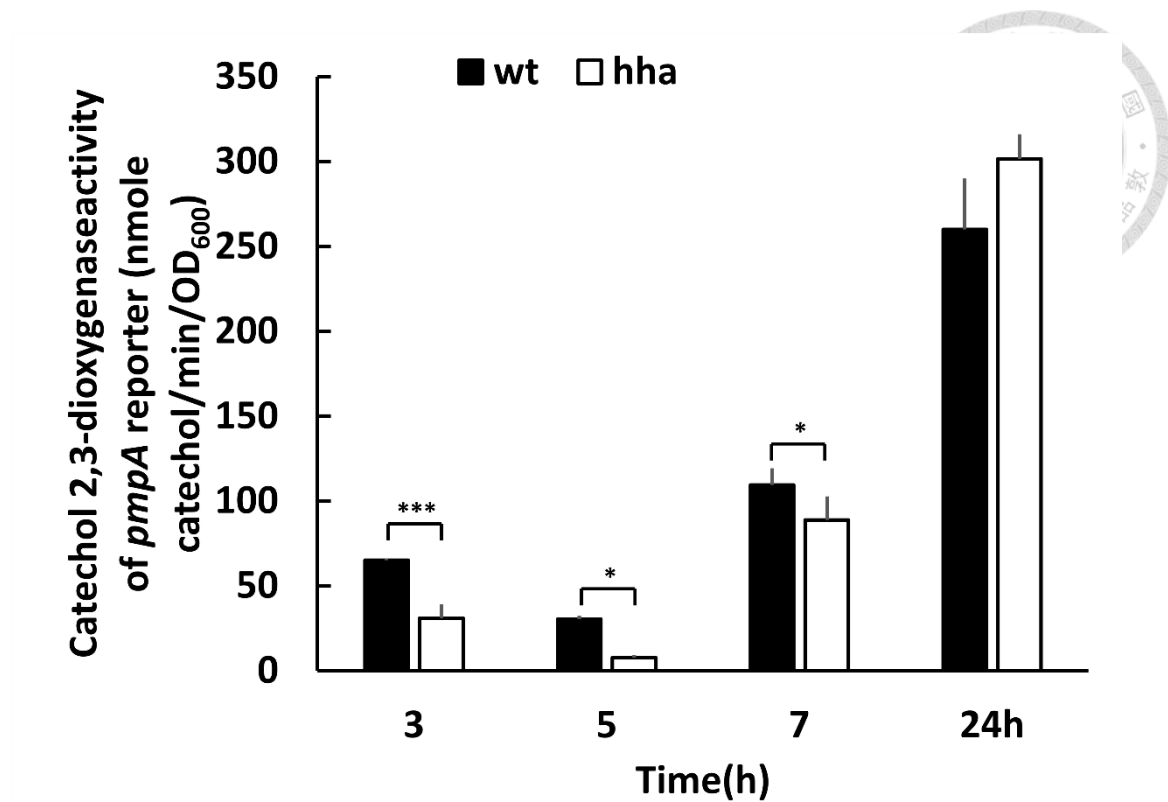
生物膜生成，以 LB 將隔夜菌液 1:100 於 96 well 培養 24 小時後，進行結晶紫染色並利用酒精與丙酮的混合物將染劑洗脫出，最後以 OD₅₇₀ 偵測及 OD₆₀₀ 校正細菌的生物膜生成能力。(A) 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互

補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector control。互補株由 0.00015% arabinoes 誘導。(B)使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 的共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoes 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。



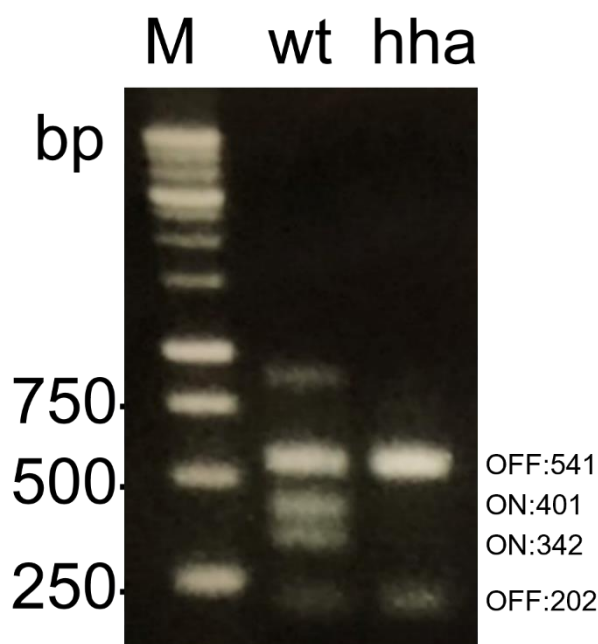
圖十六、*hha* 突變株之 eDNA 生成量顯著下降

培養 24 小時後的細菌上清液中之 eDNA，並以 OD₂₆₀ 偵測其濃度。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$ by Student's ttest), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。



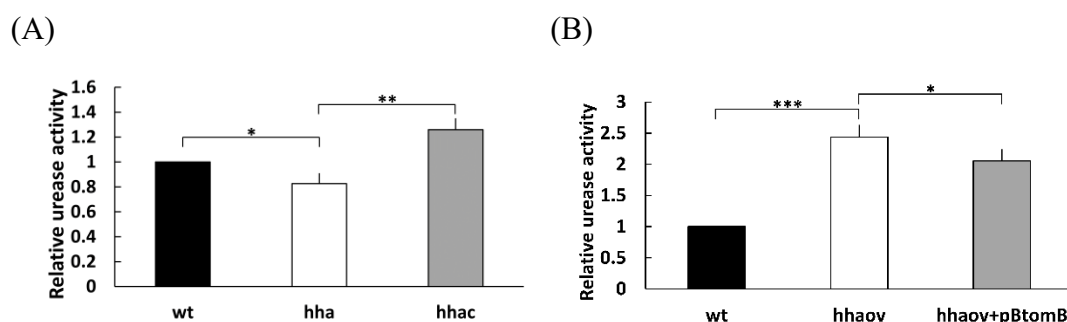
圖十七、*hha* 突變株之 *pmpA* promoter 活性較野生株顯著下降

將帶有 *pmpA* reporter plasmid 的野生株與突變株之隔夜菌液以 1:100 稀釋至 5 ml LB 培養液，並培養至第 3、5、7、24 小時時檢測其 promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant。



圖十八、*hha* 突變株之 *mrp* 表現量較野生株顯著下降

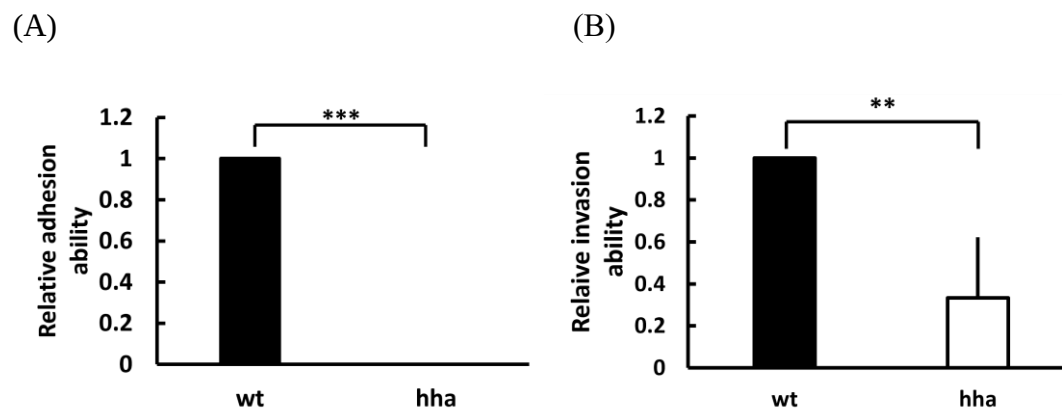
將帶有野生株與突變株之隔夜菌液以 1:100 稀釋至 5 ml LB 培養液，培養隔夜抽取 genomic DNA，並以 PCR 擴增出 *mrp* operon 的 promoter，再以 *Afl*III 切割 PCR 產物後進行電泳。



圖十九、*hha* 突變株之尿素酶活性較野生株顯著下降

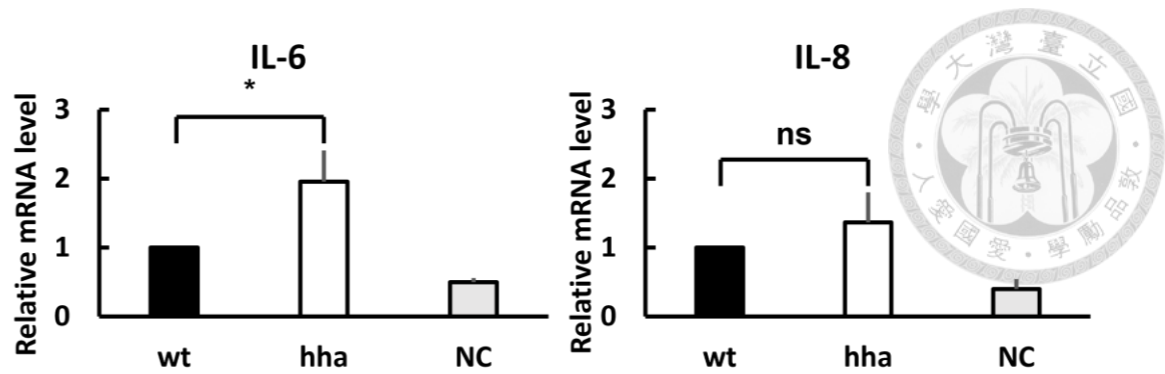
取隔夜菌液 1:100 次培養於 5 ml LB broth，以 37°C 培養 5 小時後將 OD₆₀₀ 調整為 1，取 1 ml 的菌液，離心並去除上清液，加入 500 µl 含 0.5 M 尿素的 LB 培養兩小時後，取上清液進行 Sodium Hypochlorite-Phenol 試驗，偵測 OD₆₂₅ 吸光值。(A) 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株) 均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector

control。互補株由 0.00015% arabinoes 誘導。(B)使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 的共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoes 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。



圖二十、*hha* 突變株和野生株的細胞黏附能力及入侵能力

(A) 取隔夜菌液以 RPMI-1640 調整濃度至 MOI=10 進行感染一小時，此後以 1% triton X-100 將細胞裂解，並將其序列稀釋點盤，隔夜培養後計數 CFU 並計算黏附率。(B)將細菌處理 T24 (MOI=10) 1 小時後，以 250 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin 作用 1 小時殺死胞外細菌。以 1% triton-X100 破細胞後，序列稀釋點盤隔夜計數菌數。以胞內菌數除以初始菌數以計算出細胞入侵比率。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。

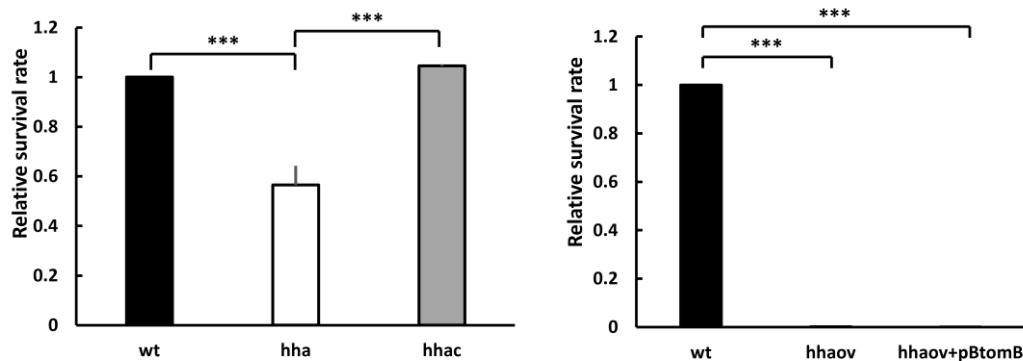


圖二十一、*hha* 突變株影響促發炎細胞素的表現量

利用隔夜菌液以 RPMI 調整菌量至 MOI=10，感染 T24 細胞一小時後抽取細胞 RNA，以 RT-qPCR 進行 IL-6 及 IL-8 的表現量分析。此為三次獨立實驗結果 (誤差線為 SD，* $p < 0.05$ by Student's t test, ns: no significant difference)，wt, wild-type; hha, *hha* mutant; NC, negative control。

(A)

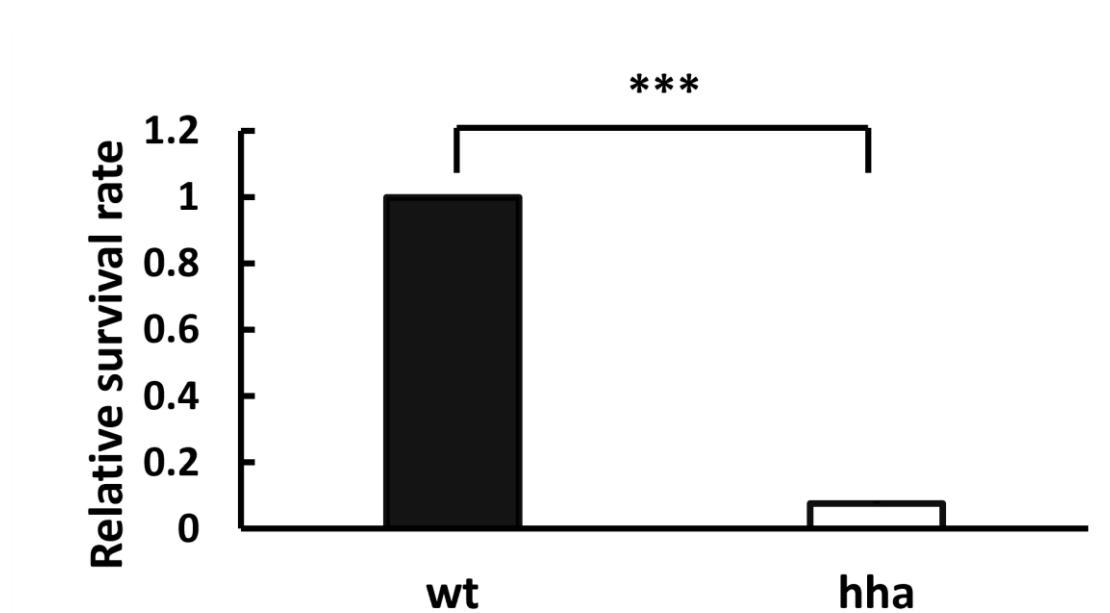
(B)



圖二十二、*hha* 突變影響細菌抗酸能力

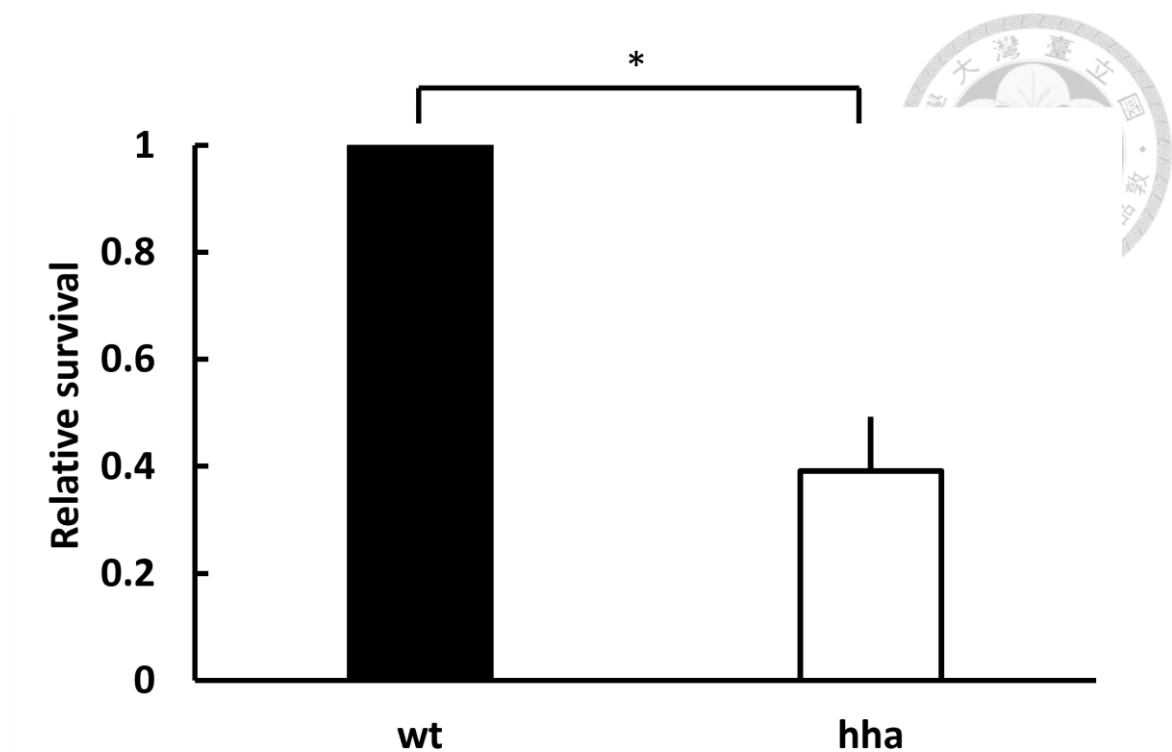
隔夜菌液以 1:100 稀釋，以乾淨 LB 再培養 5 小時，再替換為 pH 值=3 的 LB 繼續培養 2 小時。經序列稀釋後點盤培養隔夜計數菌落數目(CFU)。將處理酸性培養基的組別與未處理相除求得存活率。(A) 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。野生株、*hha* 突變株及 *hhac* (互補株)均帶有 pBAD33 質體，前兩者為 vector control。互補株由 0.00015% arabinoses 誘導。(B)使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。使用 arabinose-inducible

plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 共表達株之載體。野生株、*hha* 的單獨過表達株及 *tomB* 的共表達株均帶有 pGEM 及 pBAD33 質體。*tomB* 的共表達株由 0.015% arabinoses 誘導。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。



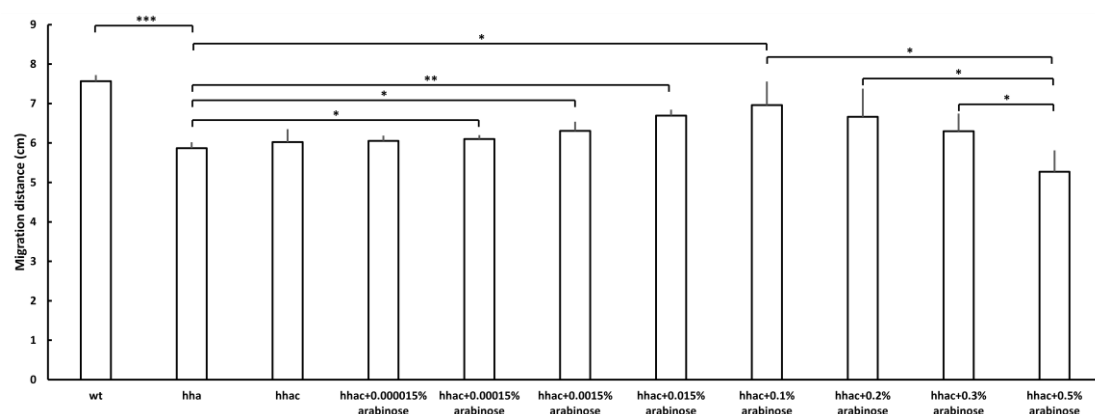
圖二十三、*hha* 突變株和野生株的巨噬細胞內存活能力

將隔夜菌液以 RPMI 調整至 MOI=10，感染已分化之 THP-1 巨噬細胞 1 小時及 4 小時，此後以 1% triton X-100 將細胞裂解，並將其序列稀釋點盤，隔夜培養後計數 CFU 並以 4 小時菌量除 1 小時菌量來計算其存活率。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。



圖二十四、*hha* 突變株之 persister cell formation 能力較野生株顯著下降

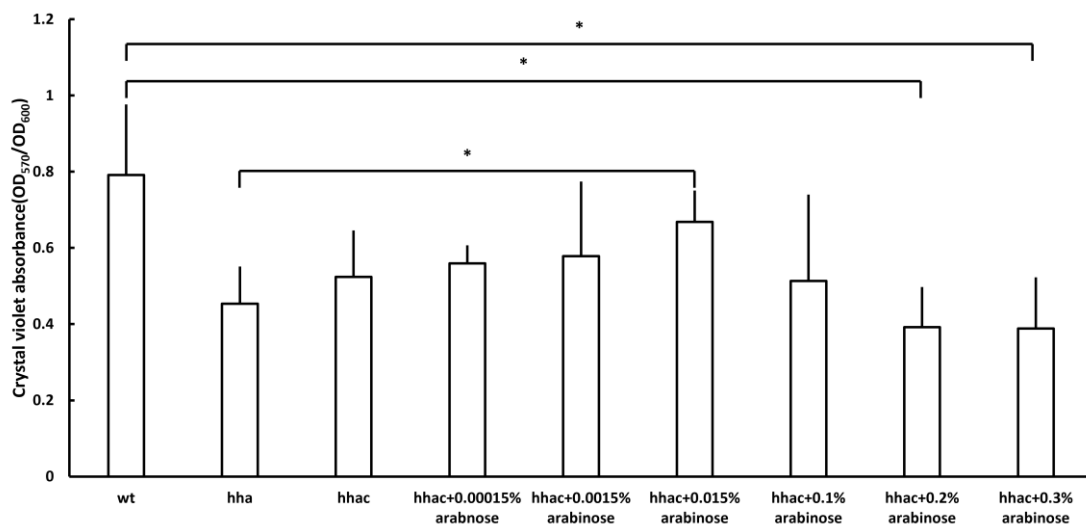
取隔夜菌液 1:100 次培養於 5 ml LB broth，以 37°C 培養 4 小時後將 OD₆₀₀ 調整為 0.1，取 1 ml 的菌液，離心並去除上清液，加入 1 ml 含 50 µg/ml ampicillin 的 LB 培養兩小時後。經序列稀釋後點盤培養隔夜計數菌落數目(CFU)。將處理 ampicillin 培養基的組別與未處理相除求得存活率。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant。



圖二十五、*P. mirabilis* 之運動性受 Hha dose-effect 的影響

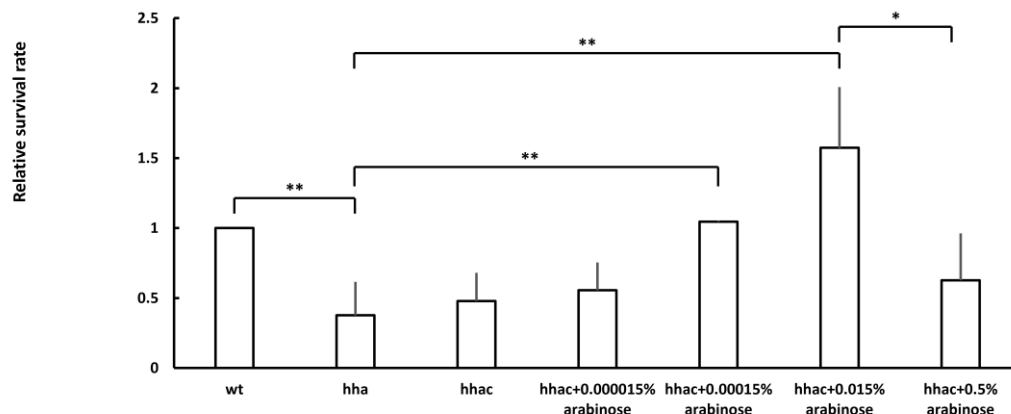
以接種針沾取隔夜菌液插入 0.3% luria agar plate 中央，於 18 小時後測量其泳動

距離。此 swimming test 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，並利用不同濃度之 arabinose 檢測 Hha dose-effect 表達株之 swimming 能力。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant; hhac, *hha*-complemented strain。



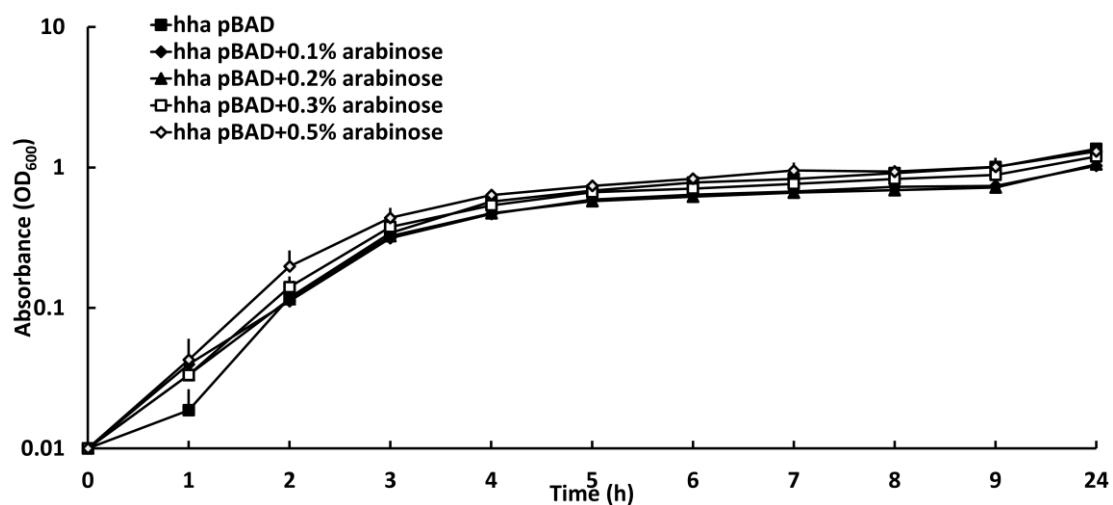
圖二十六、*P. mirabilis* 之生物膜形成能力受 Hha dose-effect 的影響

生物膜生成，以 LB 將隔夜菌液 1:100 於 96 well 培養 24 小時後，進行結晶紫染色並利用酒精與丙酮的混合物將染劑洗脫出，最後以 OD₅₇₀ 偵測及 OD₆₀₀ 校正細菌的生物膜生成能力。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，並利用不同濃度之 arabinose 檢測 Hha dose-effect 表達株之生物膜形成能力。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant; hhac, *hha*-complemented strain。



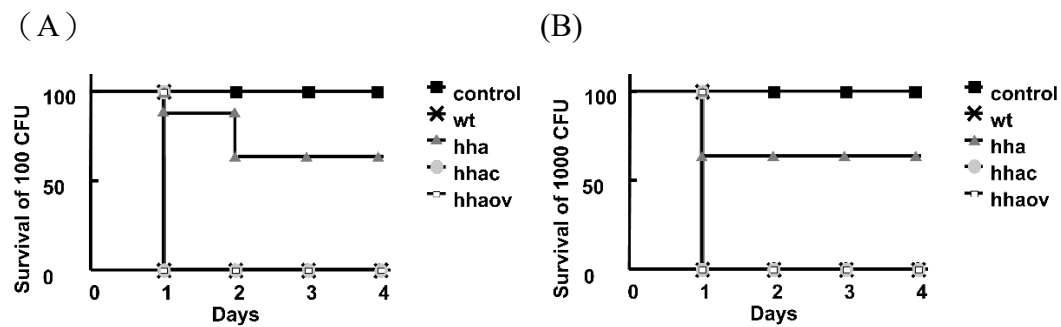
圖二十七、*P. mirabilis* 之抗酸能力受 Hha dose-effect 的影響

隔夜菌液以 1:100 稀釋，以乾淨 LB 再培養 5 小時，再替換為 pH 值=3 的 LB 繼續培養 2 小時。經序列稀釋後點盤培養隔夜計數菌落數目(CFU)。將處理酸性培養基的組別與未處理相除求得存活率。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 Hha dose-effect 表達株之載體，並利用不同濃度之 arabinose 檢測 Hha dose-effect 表達株之抗酸能力。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ by Student's t test)，wt, wild type; hha, *hha* mutant; hhac, *hha*-complemented strain。



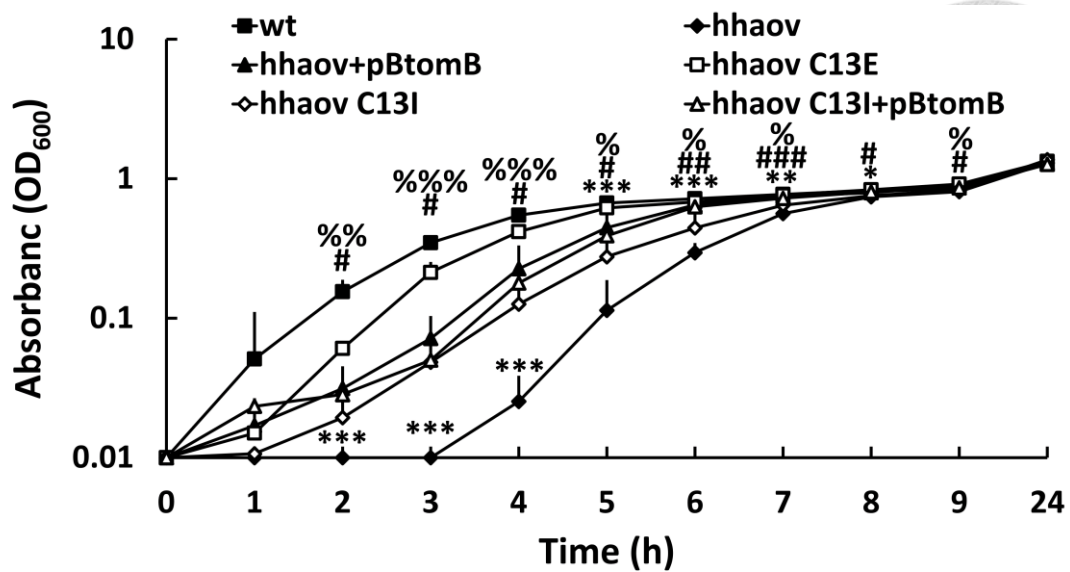
圖二十八、arabinose(0.1~0.5%)不影響帶 vector control 的 *hha* 突變株的生長

將 LB 隔夜培養菌液 OD₆₀₀ 調至 0.01 作為生長起始值，每小時以 OD₆₀₀ 偵測，Y 軸為對數刻度。*hha* 突變株均帶有 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 質體，為 vector control。此為三次獨立實驗結果（誤差線為 SD，ns: no significant difference），*hha*, *hha* mutant。



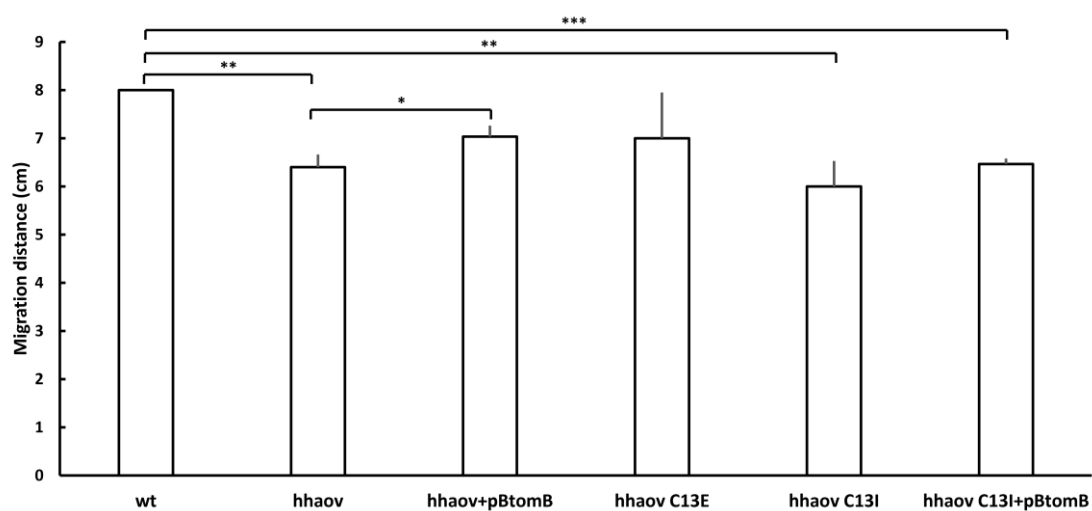
圖二十九、野生株、突變株、互補株與過度表現株於 *Galleria mellonella* 幼蟲的毒力

以細菌 (A) 100 CFU (B) 1000 CFU 感染 *Galleria mellonella* 幼蟲，觀察四天期間的存活率(%, 每組 30 只)。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為互補株之載體。互補株由 0.00015% arabinoses 誘導。使用 pGEM 作為 overexpression strain 之載體。以上感謝陽明交通大學微免所-高正彥老師之協助。wt, wild type; *hha*, *hha* mutant; *hhac*, *hha*-complemented strain; *hhaov*, *hha* overexpression strain。



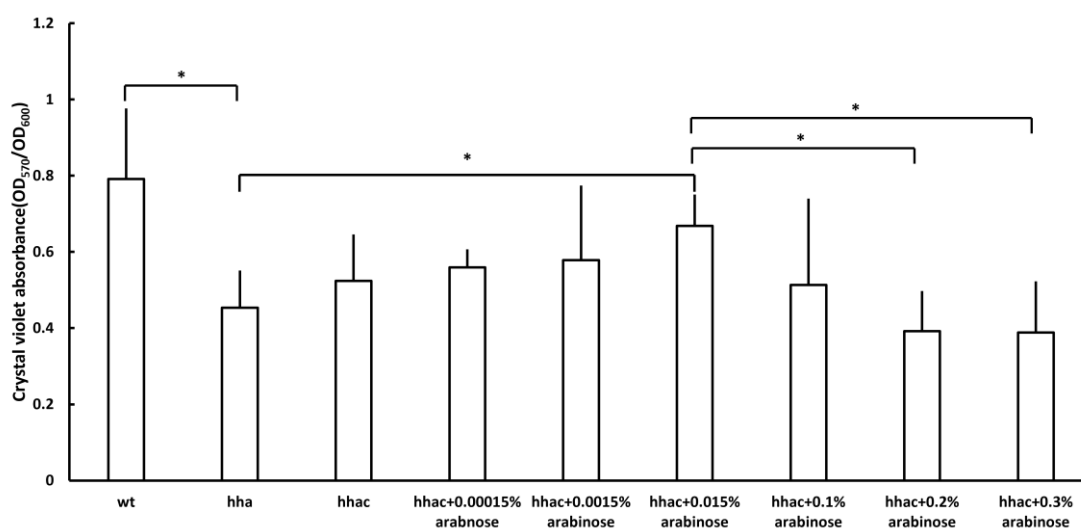
圖三十、表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致生長情況較差與 conserved 的 cysteine C13 有關

將 LB 隔夜培養菌液 OD₆₀₀ 調至 0.01 作為生長起始值，每小時以 OD₆₀₀ 偵測，Y 軸為對數刻度。此生長曲線使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 共表達株之載體，並利用 0.015% 之 arabinose 檢測 *tomB* 共表達株之生長曲線 (*為 wt 相對於 hhaov, #為 hhaov 相對於 hhaov +p*BtomB*, %為 hhaov C13I 相對於 wt)。以上實驗皆為三次獨立實驗結果。(誤差線為 SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by Student's t test), wt, wild type; hhaov, *hha* overexpression strain。



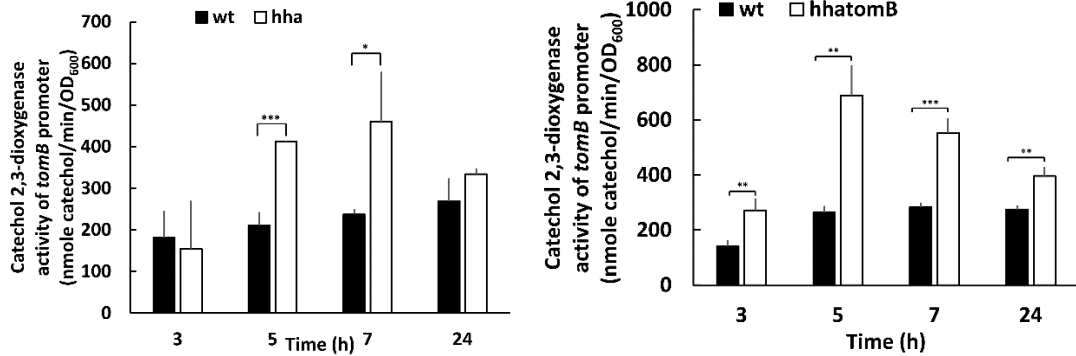
圖三十一、表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致泳動能力(swimming)較差與 conserved 的 C13 有關。

以接種針沾取隔夜菌液插入 0.3% luria agar plate 中央，於 18 小時後測量其泳動距離。此 swimming test 使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 共表達株之載體，並利用 0.015% 之 arabinose 檢測 *tomB* 共表達株之 swimming 能力。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; hhaov, *hha* overexpression strain。



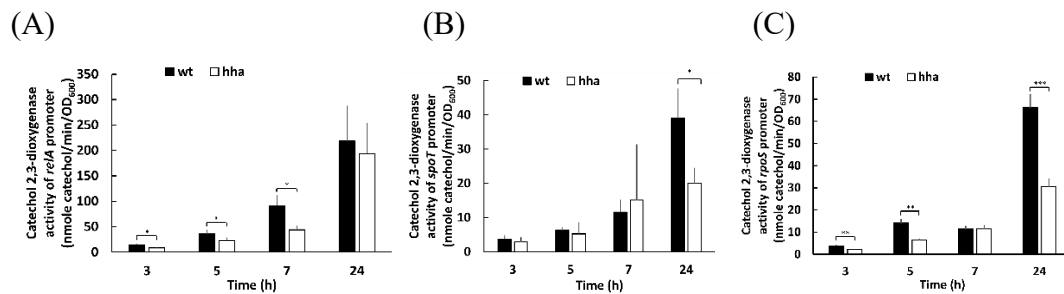
圖三十二、表現 *tomB* 恢復 *hha* 的過表達導致生物膜形成能力較差與 conserved 的 C13 有關

生物膜生成，以 LB 將隔夜菌液 1:100 於 96 well 培養 24 小時後，進行結晶紫染色並利用酒精與丙酮的混合物將染劑洗脫出，最後以 OD₅₇₀ 偵測及 OD₆₀₀ 校正細菌的生物膜生成能力。使用 arabinose-inducible plasmid-pBAD33 作為 *tomB* 共表達株之載體，並利用 0.015% 之 arabinose 檢測 *tomB* 共表達株之生物膜生成能力。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$ by Student's t test), wt, wild type; hhaov, *hha* overexpression strain。



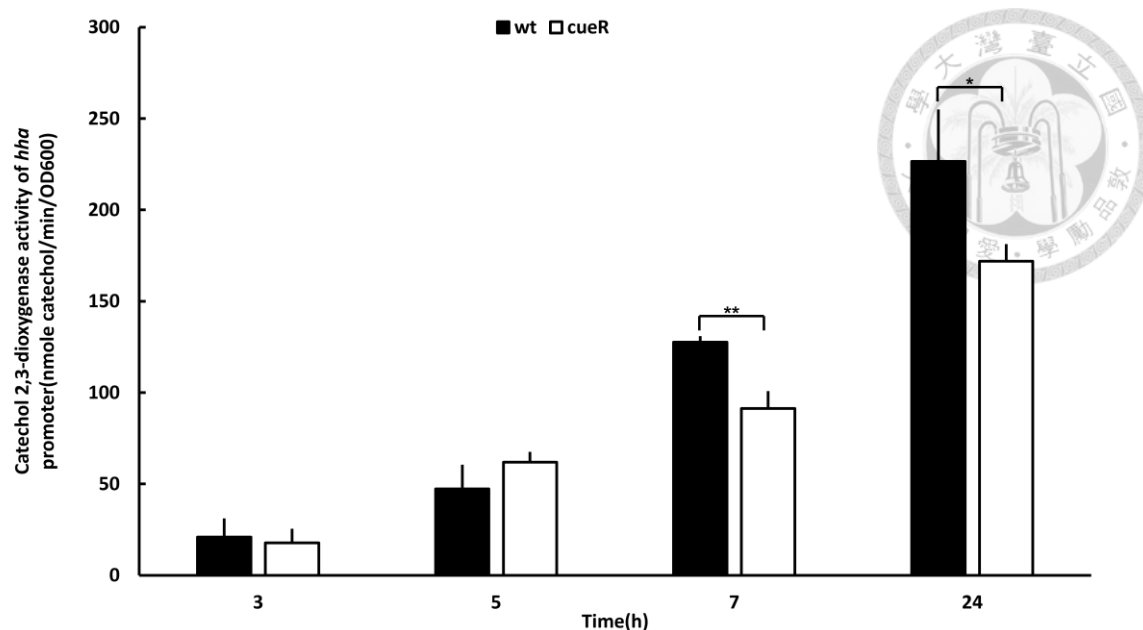
圖三十三、Hha-TomB 之 auto-regulation

將帶有 *tomB* reporter plasmid 的野生株與突變株之隔夜菌液以 1:100 稀釋至 5 ml LB 培養液，並培養至第 3、5、7、24 小時時檢測其 promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild-type; *hha*, *hha* mutant; *hhatomB*, *hhatomB* mutant。



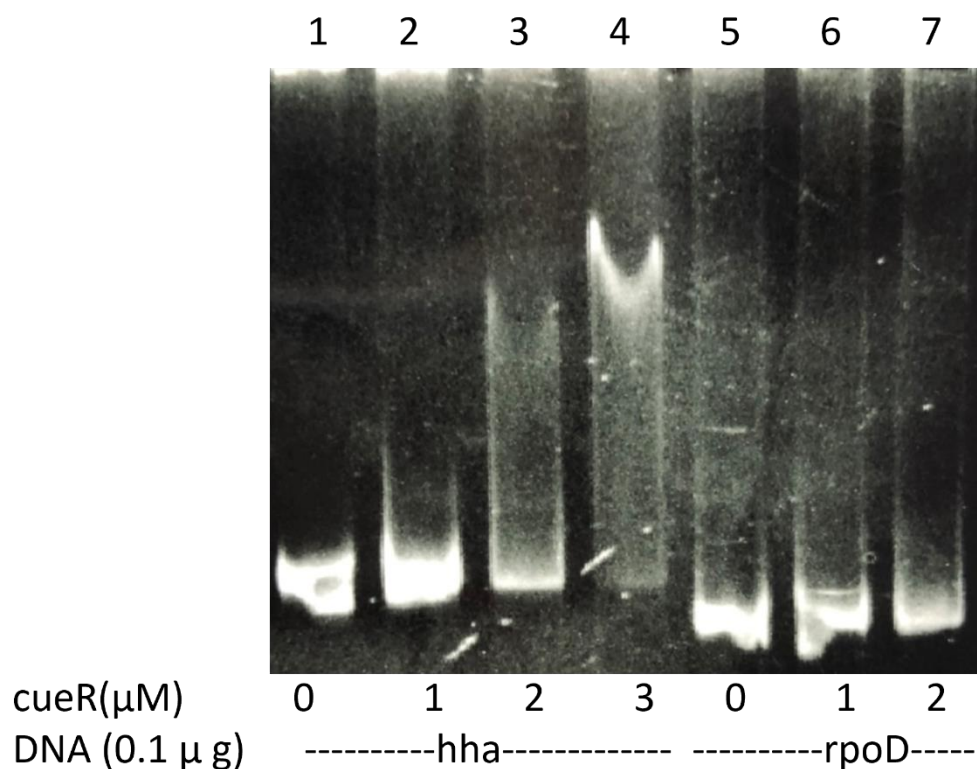
圖三十四、*hha* 突變株之 *spoT*、*relA* 與 *rpoS* promoter 活性較野生株顯著下降

(A)(B)(C)將帶有 *spoT*、*relA* 與 *rpoS* reporter plasmid 的野生株與突變株之隔夜菌液以 1:100 稀釋至 5 ml LB 培養液，並培養至第 3、5、7、24 小時時檢測其 promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Student's t test), wt, wild type; *hha*, *hha* mutant。

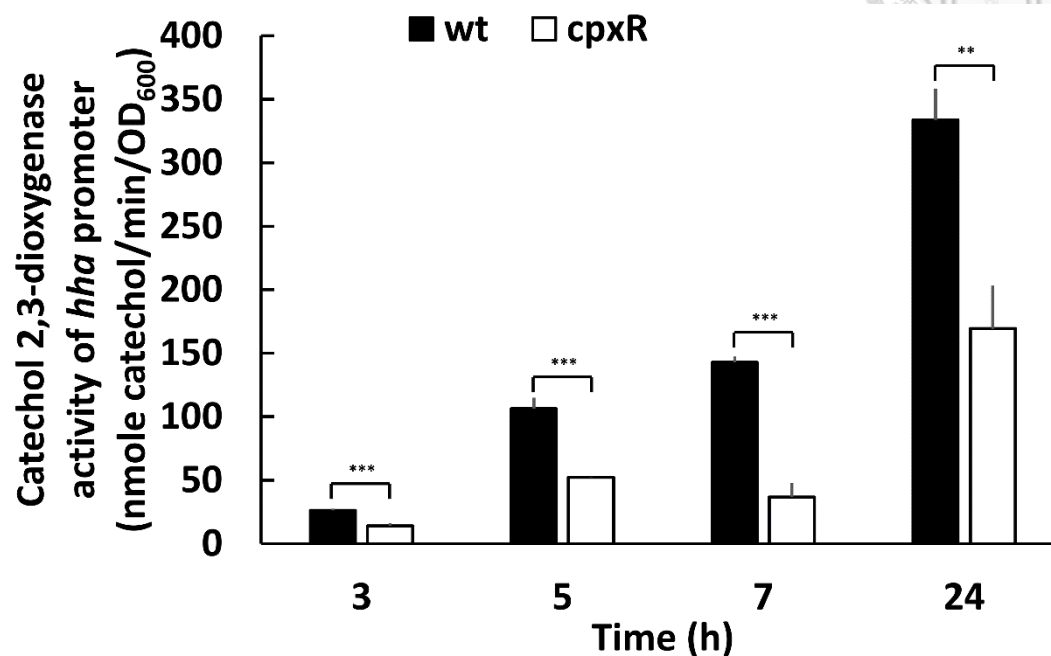


圖三十五、CueR 調控 *hha* 之基因表現

將帶有 *hha* promoter 之野生株及 *cueR* 突變株隔夜培養，此後以 1:100 稀釋後次培養於 LB，將其培養至第 3、5、7、24 小時時檢測其 *hha* promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's t test)，wt, wild type; *cueR*, *cueR* mutant。

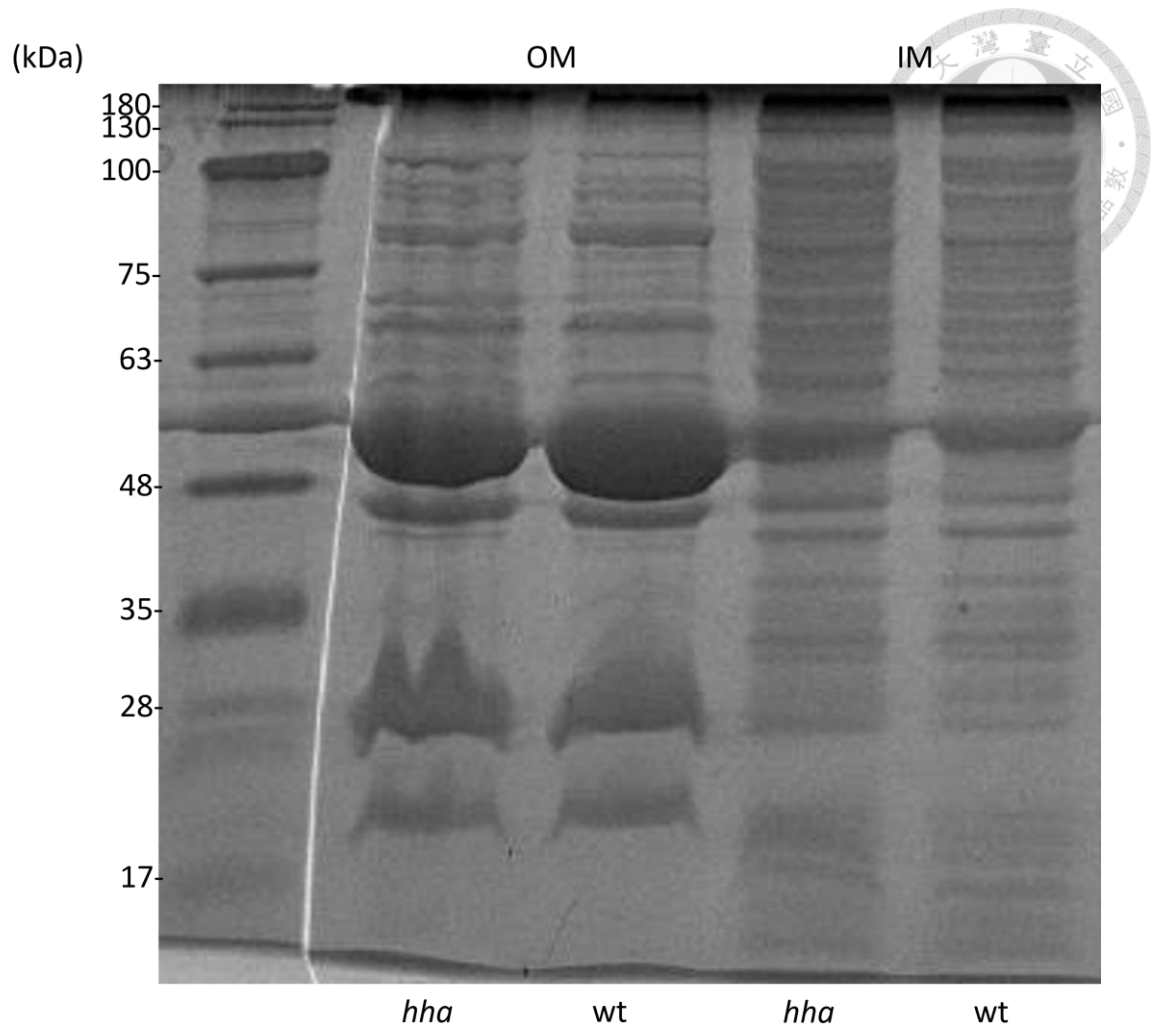


圖三十六、以 EMSA (electrophoretic mobility shift assay) 探究 CueR 與 *hha* 之關係: CueR 在濃度為 2 μ M 時就可與 *hha* 的 promoter 做結合。



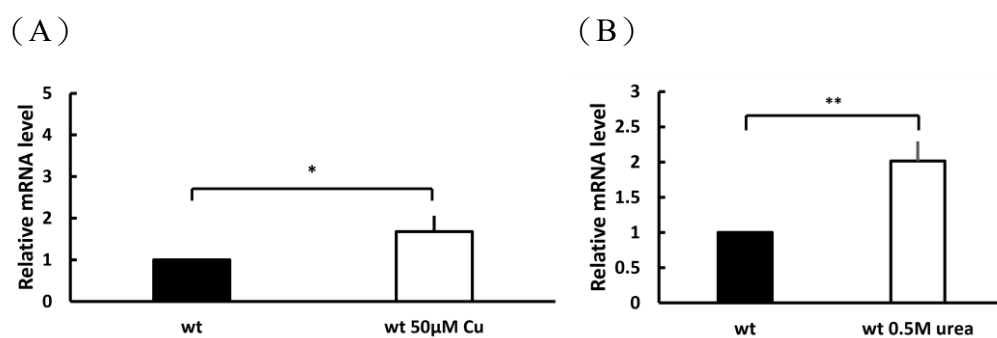
圖三十七、CpxR 正向調控 *hha* 之基因表現量

將帶有 *hha* promoter 之野生株及 *cpxR* 突變株隔夜培養，此後以 1:100 稀釋後次培養於 LB，將其培養至第 3、5、7、24 小時時檢測其 *hha* promoter 活性。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ by Student's t test)，wt, wild type; *cpxR*, *cpxR* mutant。



圖三十八、*hha* 突變株及野生株的膜蛋白分析

萃取生長 18 小時之野生株與 *hha* 突變株的外膜及內膜蛋白進行 12.5% SDS-PAGE 蛋白質電泳分析。



圖三十九、銅或尿素（高滲透壓）會誘導 *hha* 表現。

(A) 取隔夜菌液 1:100 次培養於 5 ml LB broth，以 37°C 培養 4 小時後將

OD₆₀₀ 調整為 1，取 1 ml 的菌液，離心並去除上清液，加入 1 ml 含 50 μ M Cu 的 LB 培養一小時後，純化此時間點的 RNA 並將其進行反轉錄，此後以 RT-qPCR 方式來分析 *hha* 的表現量，其中以 *gyrB* 為 internal control。(B) 取隔夜菌液 1:100 次培養於 5 ml LB broth，以 37°C 培養 4 小時後將 OD₆₀₀ 調整為 1，取 1 ml 的菌液，離心並去除上清液，加入 1 ml 含 0.5 M 尿素的 LB 培養一小時後，純化此時間點的 RNA 並將其進行反轉錄，此後以 RT-qPCR 方式來分析 *hha* 的表現量，其中以 *gyrB* 為 internal control。此為三次獨立實驗結果(誤差線為 SD，* $p < 0.05$ by Student's t test)，wt, wild type。

第六章 表



表一、*hha* 突變株在高銅濃度環境下菌體內堆積銅離子較野生株高

strain	LB	2 mM Cu LB
wt	4.311±0.8 (μg/L)	211.518±2.47 (μg/L)
<i>hha</i>	5.499±1.15 (μg/L)	237.118±31.36 (μg/L)

表二、實驗中所使用的菌株及質體

Strains or plasmids	Description	Reference
<i>P. mirabilis</i>		
wt	Wild-type N ₂ ; Tet ^r	Clinical isolate
wt-pGEM	wt contain pGEM; Km ^r , Amp ^r	
wt-pACYC	wt contain pACYC; Km ^r , Cm ^r	
wt-pBAD	wt contain pBAD; Km ^r , Cm ^r	
<i>hha</i> mutant	N2 <i>hha</i> : mini-Tn5 Km1, Km ^r	This study
<i>hhatomB</i> mutant	<i>hhatomB</i> knockout mutant contain Km1 cassette; Km ^r	By Vivien Cheng
<i>hha</i> -pACYC	<i>hha</i> mutant contain pACYC; Km ^r , Cm ^r	
<i>hhac</i>	<i>hha</i> mutant contain pBAD33- <i>hha</i> ; Km ^r , Cm ^r	
<i>hhaov</i>	<i>hha</i> overexpression contain pGEM; Amp ^r	

<i>cueR</i> -pACYC	<i>cueR</i> contain pACYC; Km ^r , Cm ^r	By Lu Wang
<i>cpxR</i> -pACYC	<i>cpxR</i> contain pACYC; Km ^r , Cm ^r	By Yu-Han Yuan
<i>E. coli</i>		
DH5α	transformation	Invitrogen
S17-1 λ pir	conjugation	Biomedical
Plasmid		
pGEM-T Easy	High-copy TA cloning vector; Amp ^r	Promega
pUT/ mini-Tn5 Km1	suicide plasmid for conjugation ; Amp ^r , Km ^r	
pACYC184- <i>relA</i> :: <i>xylE</i>	reporter assay;Cm ^r	This study
pACYC184- <i>spoT</i> :: <i>xylE</i>	reporter assay;Cm ^r	
pACYC184- <i>flhDC</i> :: <i>xylE</i>	reporter assay;Cm ^r	
pACYC184- <i>hha</i> :: <i>xylE</i>	reporter assay;Cm ^r	
pACYC184- <i>tomB</i> :: <i>xylE</i>	reporter assay;Cm ^r	
Tet, tetracycline; Amp, ampicillin; Km, kanamycin; Cm, chloramphenicol.		

表三、實驗中所用的引子

Primer	Sequence(5' to 3')	Description
--------	--------------------	-------------



I-out primer	GAGCTCGAATTCGGCCTAG	For Nested PCR
O-out	CCTGCAGGCATGCAAGCTTC	
O-out 2.0	CTGCGCAGGGCTTTATTG	
R1	GGCCACGCGTCGACTAGTACTCAACTGTTCA CGCC	
R2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
Km1-F	CACGTTGTGTCTCAAAATC	For mutant check
Km1-R	TTAGAAAACTCATCGAGC	
<i>xylE</i> -orf-F(R)	CGGTCGCATTACACCTTTG	For reporter plasmids check
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	For overexpression check
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
<i>SphI</i> - <i>flhDC</i> - reporter-F	<u>GCATGCA</u> AAAAAGTAACATTTGCTATT	For <i>flhDC</i> reporter assay

*Pst*I-*flhDC* -

CTGCAGCTCTTTACATCCCGTCCGAT

reporter-R

*Sph*I-*tomB*-

CGTGCATGCGGCTACCCATCAAAAAGG

reporter-F

*Pst*I-*tomB* -

AGCCTGCAGGCGGTACCTTTATCTAATGA

reporter-R

hha-reporter-F GTCATGTTGTCTTTTCTC

hha -reporter-R CCAGAAAAAATAGATTTAGC

hha F

TAGAGAAAAGACAACATGAC

overexpression

hha R

TGCTAATACGATTATCTTAC

overexpression

*Kpn*I-*hha* F

complementati GGGGTACCTAGAGAAAAGACAACATGAC

on

*Xba*I-*hha* R

complementati GCTCTAGAT TGCTAATACGATTATCTTACAA

on



For *tomB*

reporter assay

For *hha*

reporter assay

For *hha*

overexpression

For *hha*

complementati

on



tomB upstream

GGAAAAAGAGGGTAAAGGG

F

XbaI-tomB

TCTAGACCATAGCTTATTGTGACTG

upstream R

XbaI-hha

TCTAGAGCAAGTAACCATAGTATCC

downstream F

hha

CGTAAACAATAGGCTTATGG

downstream R

gyrB-RT-F

GACCCGTACGCTAAACAAC

For *gyrB*

qPCR

gyrB-RT-R

AGAAATAACCGCAATCAGG

hha-RT-F

AATGCACCTCAATCGAAACC

For *hha*

qPCR

hha-RT-R

CAGATGCTGGGATCTTGTC

TNF α -RT-F

CACGCTCTTCTGCCTGCTG

For cytokine

qPCR

TNF α -RT-R

GATGATCTGACTGCCTGGGC

IL-8-RT-F

CACACTGCGCCAACACA

IL-8-RT-R TCAGCCCTCTTCAAAAACCT

IL-6-RT-F GGTCTTTTGGAGTTTGAGG

IL-6-RT-R AGGCTGGCATTGTGGTT

GAPDH-RT-F CCTCAAGATCATCAGCAATG

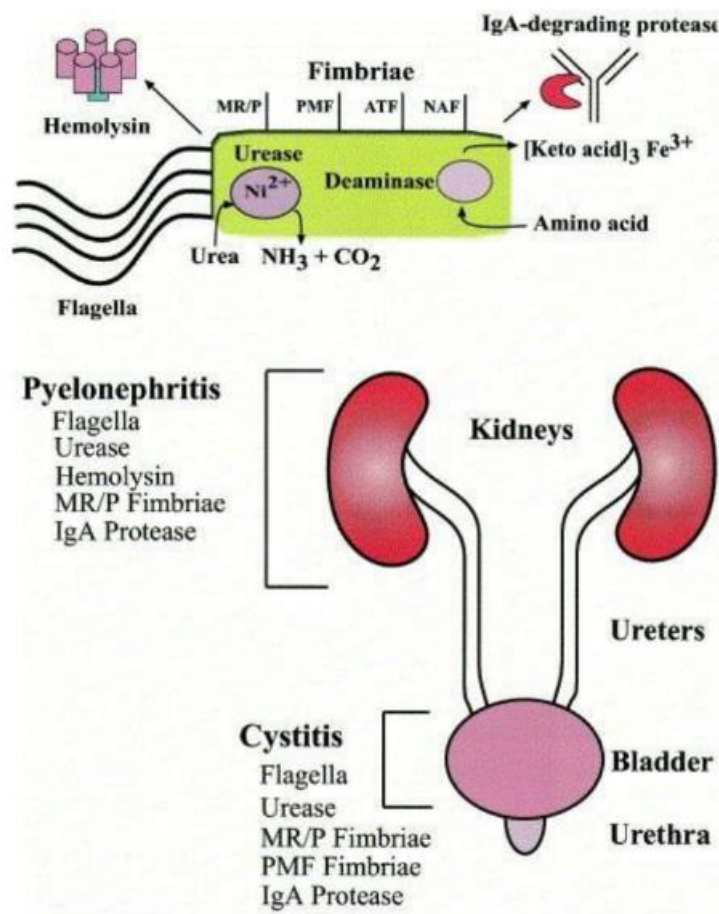
GAPDH-RT-R CACGATACCAAAGTTGTCAT



表四、*hha* 突變株的表現型分析整理

Phenotype		<i>hha</i> vs wt
Virulence factors	Swarming motility (<i>flhDC</i> reporter↓)	↓
	Swimming motility	↓
	Biofilm formation (eDNA↓)	↓
	Urease activity	↓
	Copper resistance	↓
Stress tolerance	Acid tolerance	↓
	Adhesion	↓
	Invasion	↓
Cell colonization	Macrophage survival	↓

附錄



Microbes Infect. 2000 Oct;2(12):1497-505.

附錄一、*P. mirabilis* 之毒力因子

Virulence factors produced by *P. mirabilis* and possible sites of action during infection

in the urinary tract. Top. Proteins produced by *P. mirabilis* that are known or

hypothesized to be virulence factors important in urinary tract infections. The urinary

tract showing urethra, bladder, ureters and kidneys. A list of virulence factors

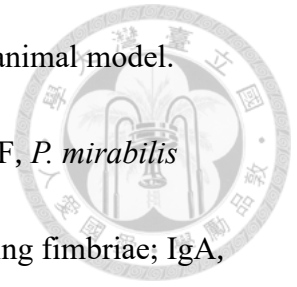
produced by *P. mirabilis* important for causing cystitis (infection of the bladder) or

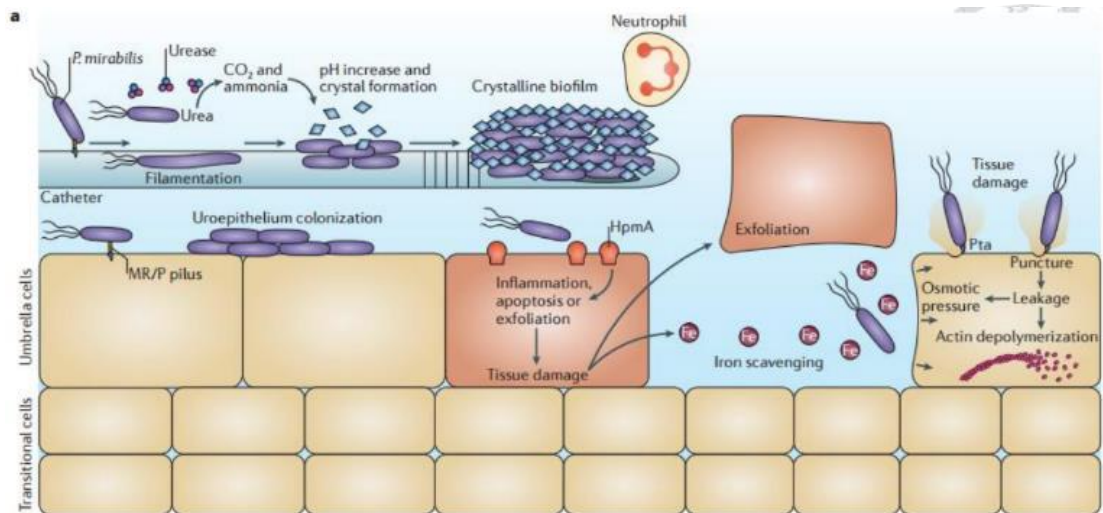
pyelonephritis (infection of the kidney parenchyma) as assessed in animal model.

Abbreviations: MR/P, mannose-resistant/Proteus-like fimbriae; PMF, *P. mirabilis*

fimbriae; ATF, ambient temperature fimbriae; NAF, non-agglutinating fimbriae; IgA,

immunoglobulin A.



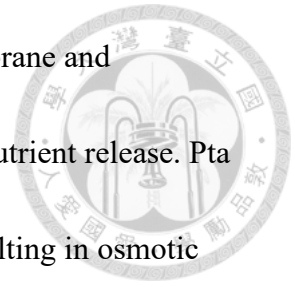


Nat Rev Microbiol. 2015 May; 13(5): 269–284.

附錄二、*P. mirabilis* 之尿道感染過程

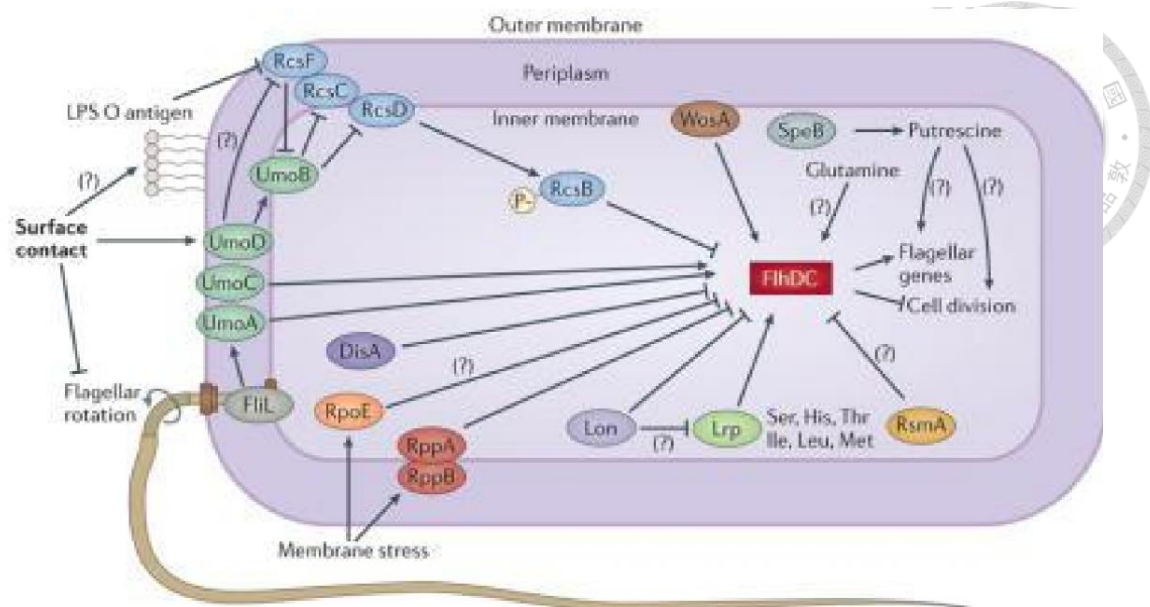
CAUTIs mediated by *P. mirabilis* depend on the expression of MR/P pili for initial attachment, and for biofilm formation on the catheter and in the bladder. Subsequent urease production induces the formation of calcium crystals and magnesium ammonium phosphate precipitates in the urine through the hydrolysis of urea to carbon dioxide and ammonia, resulting in a high pH. The production of extracellular polymeric substances attached to the catheter traps these crystals, allowing the formation of a crystalline biofilm, which protects the community from the host immune system and from antibiotics. These structures prevent proper urine drainage, resulting in reflux and promoting the progression to pyelonephritis. Finally, production of the bacterial toxins haemolysin (HpmA) and Proteus toxic agglutinin (Pta) is important for tissue destruction and bacterial dissemination to the kidneys.

HpmA induces pore formation by inserting itself into the cell membrane and destabilizing the host cell, causing tissue damage, exfoliation and nutrient release. Pta punctures the host cell membrane, causing cytosol leakage and resulting in osmotic stress and depolymerization of actin filaments, thus compromising the structural integrity of the cell. The release of nutrients via these toxins also allows the bacteria to scavenge iron using siderophores.



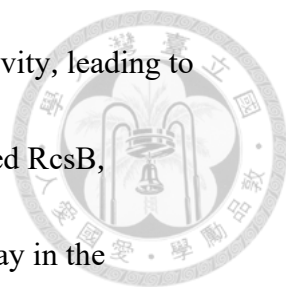
Swarming cycle of *Proteus* bacilli growing on solid media. Swarmer cell

differentiation and swarming motility are cyclic. A short, vegetative bacillus (swimmer cell), as observed in liquid culture, differentiates on solid media into the highly flagellated, polyploid, elongated swarmer cell. This process is controlled through the environmental signals, e.g., reduction of flagellum rotation and/or glutamine, a specific chemical stimulus. Then, the population of swarmer cells migrates rapidly and coordinately away from the initial point of inoculation until the number of swarmer cells is reduced. At the consolidation stage, swarming motility is stopped and swarmer cells, after dedifferentiation, revert to swimmer cells, i.e., short rods.



附錄四、*P. mirabilis* 之表面移行調控機制

P. mirabilis swarm cell differentiation have revealed a complex regulatory network, with most factors acting on the flagellar transcriptional regulator (FlhDC). Some of these factors alter gene expression, and others modify protein level; in the figure, all factors are shown as affecting FlhDC, for simplicity. The regulator of colanic acid capsule synthesis (Rcs) phosphorelay, composed of a response regulator (RcsB), a sensor kinase (RcsC), an outer-membrane activator (RcsF) and a phosphotransferase (RcsD; also known as RsbA), ultimately results in phosphorylated RcsB, which represses *flhDC*. When *P. mirabilis* contacts a surface under conditions that are favourable for swarming, this signal is sensed and propagated by some combination of the inhibition of flagellar rotation, FliL, WosA and changes in the cell wall involving the O antigen of lipopolysaccharide (LPS). The signal is relayed by inhibition of RcsF



and increased upregulator of flagellar master operon D (UmoD) activity, leading to activation of UmoB and, consequently, a reduction in phosphorylated RcsB, alleviating *flhDC* repression. The importance of the Rcs phosphorelay in the regulation of swarm cell differentiation is further underscored by the finding that disruption of *rcsD* alleviates the requirement for surface contact and allows the formation of elongated cells in liquid culture. In addition to the Rcs system, Lon protease negatively regulates swarming by degrading FlhD and possibly also leucine-responsive regulator (Lrp). RppA negatively regulates flagellin synthesis by decreasing expression of *flhDC* as well as modulating LPS synthesis and RNA polymerase σ factor RpoE may respond to membrane stress sensed by the RppAB system by decreasing expression of *flhDC*. The putative tyrosine decarboxylase DisA also negatively regulates swarming by decreasing expression of the class 2 and class 3 flagellar genes. The carbon storage regulator (CsrA) homologue RsmA inhibits swarming when overexpressed, possibly by regulating *flhDC* expression. The amino acid glutamine promotes swarm cell differentiation under normally nonpermissive conditions, and the polyamine putrescine (generated by agmatinase (SpeB)) is required for swarming, although their mechanisms of action are not yet known. Thus, initiation of swarming requires the integration of numerous signals and is intimately connected to the metabolic status of the bacterium, membrane integrity, and cell wall

changes associated with surface contact.



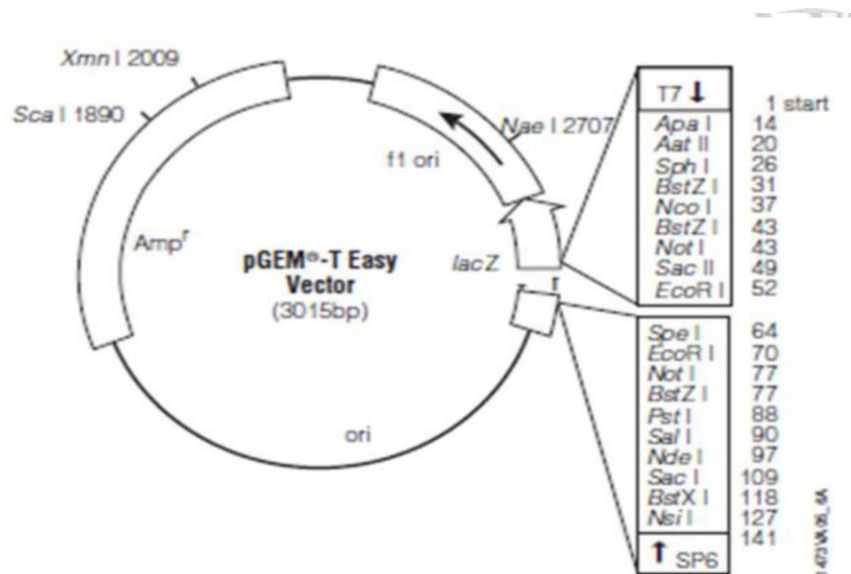
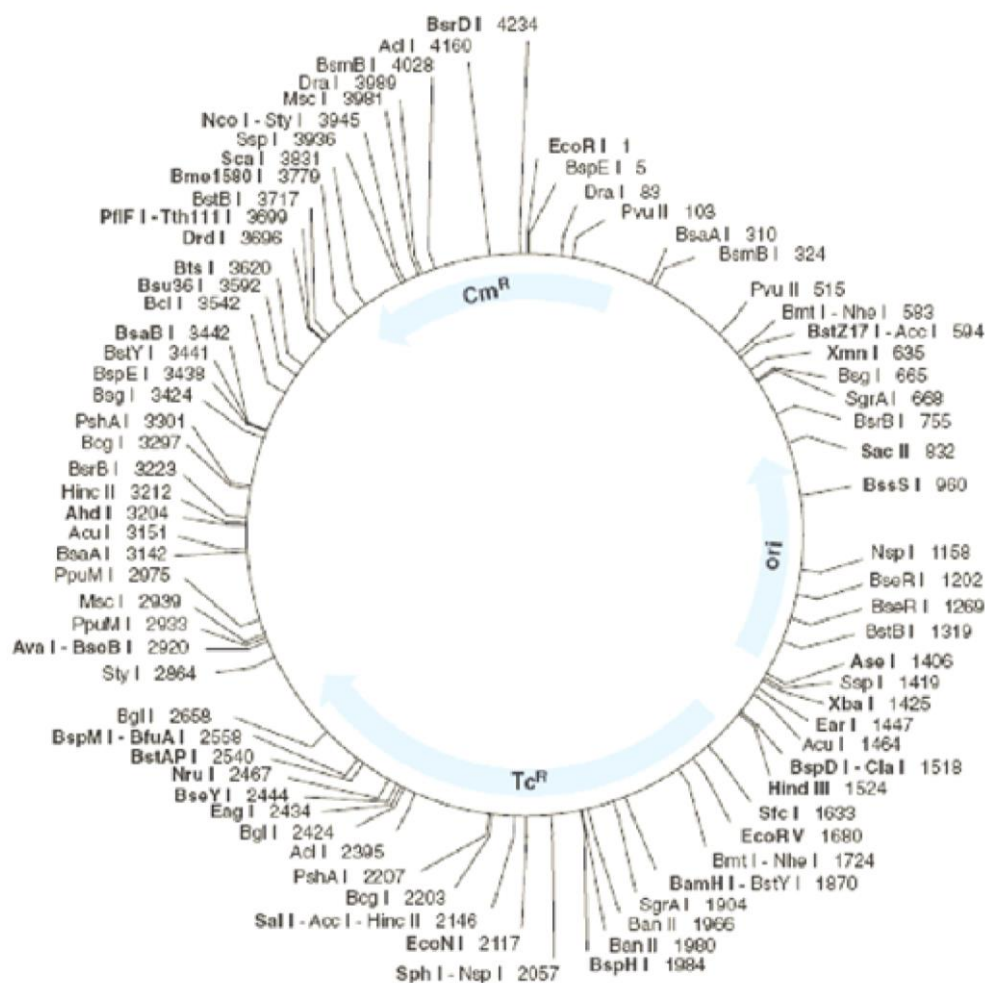


Figure 3. pGEM®-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM®-T Easy Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10-128
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176-197
lacZ start codon	180
lac operator	200-216
β-lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
lac operon sequences	2836-2996, 166-395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949-2972
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3

附錄五、pGEM®-T Easy cloning vector map (Promega)

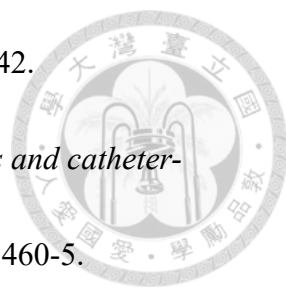


附錄六、pACYC-184 map

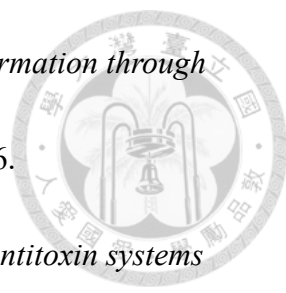
參考文獻



1. Rózalski, A., Z. Sidorczyk, and K. Kotełko, *Potential virulence factors of Proteus bacilli*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(1): p. 65-89.
2. Schaffer, J.N. and M.M. Pearson, *Proteus mirabilis and Urinary Tract Infections*. Microbiol Spectr, 2015. **3**(5).
3. Armbruster, C.E. and H.L. Mobley, *Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of Proteus mirabilis*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(11): p. 743-54.
4. Rauprich, O., et al., *Periodic phenomena in Proteus mirabilis swarm colony development*. J Bacteriol, 1996. **178**(22): p. 6525-38.
5. Givskov, M., et al., *Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of Serratia liquefaciens MGI*. J Bacteriol, 1998. **180**(3): p. 742-5.
6. Tsai, Y.L., et al., *cAMP receptor protein regulates mouse colonization, motility, fimbria-mediated adhesion, and stress tolerance in uropathogenic Proteus mirabilis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 7282.
7. Mobley, H.L., et al., *Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of Proteus mirabilis and Proteus vulgaris against cultured human renal proximal*

- 
- tubular epithelial cells*. Infect Immun, 1991. **59**(6): p. 2036-42.
8. Jacobsen, S.M. and M.E. Shirtliff, *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. Virulence, 2011. **2**(5): p. 460-5.
 9. Coker, C., et al., *Pathogenesis of Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect, 2000. **2**(12): p. 1497-505.
 10. Böckelmann, U., et al., *Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **262**(1): p. 31-8.
 11. Campoccia, D., L. Montanaro, and C.R. Arciola, *Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
 12. Hu, W., et al., *DNA builds and strengthens the extracellular matrix in Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51905.
 13. Trunk, T., H.S. Khalil, and J.C. Leo, *Bacterial autoaggregation*. AIMS Microbiol, 2018. **4**(1): p. 140-164.
 14. Goldstein, S. and G. Czapski, *The role and mechanism of metal ions and their complexes in enhancing damage in biological systems or in protecting these systems from the toxicity of O₂*. J Free Radic Biol Med, 1986. **2**(1): p. 3-11.
 15. Rensing, C. and G. Grass, *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis

- in a changing environment*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 197-213.
16. Tanner, M.S., et al., *Increased hepatic copper concentration in Indian childhood cirrhosis*. Lancet, 1979. **1**(8128): p. 1203-5.
17. Cuypers, A., et al., *Cadmium stress: an oxidative challenge*. Biometals, 2010. **23**(5): p. 927-40.
18. Koppenol, W.H., *The Haber-Weiss cycle--70 years later*. Redox Rep, 2001. **6**(4): p. 229-34.
19. Macomber, L. and J.A. Imlay, *The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(20): p. 8344-9.
20. Ramisetty, B.C.M., *Regulation of Type II Toxin-Antitoxin Systems: The Translation-Responsive Model*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 895.
21. Lee, K.Y. and B.J. Lee, *Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin-Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria*. Toxins (Basel), 2016. **8**(10).
22. Fraikin, N., F. Goormaghtigh, and L. Van Melderen, *Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions*. J Bacteriol, 2020. **202**(7).
23. Wang, X. and T.K. Wood, *Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(16): p. 5577-83.

- 
24. Soo, V.W. and T.K. Wood, *Antitoxin MqsA represses curli formation through the master biofilm regulator CsgD*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3186.
25. Kolodkin-Gal, I., et al., *A differential effect of E. coli toxin-antitoxin systems on cell death in liquid media and biofilm formation*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6785.
26. Wang, X., et al., *Type VII Toxin/Antitoxin Classification System for Antitoxins that Enzymatically Neutralize Toxins*. Trends Microbiol, 2021. **29**(5): p. 388-393.
27. Paul, P., et al., *The Hha-TomB toxin-antitoxin module in Salmonella enterica serovar Typhimurium limits its intracellular survival profile and regulates host immune response*. Cell Biol Toxicol, 2022. **38**(1): p. 111-127.
28. Norton, J.P. and M.A. Mulvey, *Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic Escherichia coli*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002954.
29. Sharma, V.K. and B.L. Bearson, *Hha controls Escherichia coli O157:H7 biofilm formation by differential regulation of global transcriptional regulators FlhDC and CsgD*. Appl Environ Microbiol, 2013. **79**(7): p. 2384-96.
30. Kim, Y. and T.K. Wood, *Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq*

are involved in persister cell formation through MqsR in Escherichia coli.

Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p. 209-13.



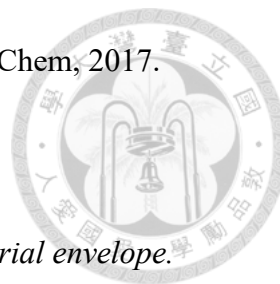
31. de la Cruz, F., M. Carmona, and A. Juaréz, *The Hha protein from Escherichia coli is highly homologous to the YmoA protein from Yersinia enterocolitica.* Mol Microbiol, 1992. **6**(22): p. 3451-2.
32. Nieto, J.M., et al., *The hha gene modulates haemolysin expression in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 1991. **5**(5): p. 1285-93.
33. Madrid, C., et al., *The novel Hha/YmoA family of nucleoid-associated proteins: use of structural mimicry to modulate the activity of the H-NS family of proteins.* Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 7-14.
34. Belas, R., D. Erskine, and D. Flaherty, *Transposon mutagenesis in Proteus mirabilis.* J Bacteriol, 1991. **173**(19): p. 6289-93.
35. Wu, Y. and F.W. Outten, *IscR controls iron-dependent biofilm formation in Escherichia coli by regulating type I fimbria expression.* J Bacteriol, 2009. **191**(4): p. 1248-57.
36. Horng, Y.T., et al., *Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system components positively regulate Klebsiella biofilm formation.* J Microbiol Immunol Infect, 2018. **51**(2): p. 174-183.
37. Wu, J., et al., *Pyruvate-associated acid resistance in bacteria.* Appl Environ



- Microbiol, 2014. **80**(14): p. 4108-13.
38. Peerbooms, P.G., A.M. Verweij, and D.M. MacLaren, *Vero cell invasiveness of Proteus mirabilis*. Infect Immun, 1984. **43**(3): p. 1068-71.
39. Giulietti, A., et al., *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*. Methods, 2001. **25**(4): p. 386-401.
40. Kim, W., et al., *The Neutrally Charged Diarylurea Compound PQ401 Kills Antibiotic-Resistant and Antibiotic-Tolerant Staphylococcus aureus*. mBio, 2020. **11**(3).
41. Fukuoka, T., et al., *Increase in susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to carbapenem antibiotics in low-amino-acid media*. Antimicrob Agents Chemother, 1991. **35**(3): p. 529-32.
42. Schweizer, H.P. and T.T. Hoang, *An improved system for gene replacement and xyle fusion analysis in Pseudomonas aeruginosa*. Gene, 1995. **158**(1): p. 15-22.
43. Jaiswal, S., et al., *The Hha-TomB Toxin-Antitoxin System Shows Conditional Toxicity and Promotes Persister Cell Formation by Inhibiting Apoptosis-Like Death in S. Typhimurium*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38204.
44. García-Contreras, R., et al., *Protein translation and cell death: the role of rare tRNAs in biofilm formation and in activating dormant phage killer genes*.



- PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2394.
45. Marimon, O., et al., *An oxygen-sensitive toxin-antitoxin system*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13634.
46. Grosse, C., S. Friedrich, and D.H. Nies, *Contribution of extracytoplasmic function sigma factors to transition metal homeostasis in Cupriavidus metallidurans strain CH34*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007. **12**(3-4): p. 227-40.
47. Pontel, L.B., A. Pezza, and F.C. Soncini, *Copper stress targets the rcs system to induce multiaggregative behavior in a copper-sensitive Salmonella strain*. J Bacteriol, 2010. **192**(23): p. 6287-90.
48. Williams, C.L., et al., *Characterization of Acinetobacter baumannii Copper Resistance Reveals a Role in Virulence*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 16.
49. Qin, Y., et al., *Genome Sequences of Three Highly Copper-Resistant Salmonella enterica subsp. I Serovar Typhimurium Strains Isolated from Pigs in Denmark*. Genome Announc, 2014. **2**(6).
50. Outten, F.W., et al., *Transcriptional activation of an Escherichia coli copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31024-9.
51. Quintana, J., L. Novoa-Aponte, and J.M. Argüello, *Copper homeostasis*

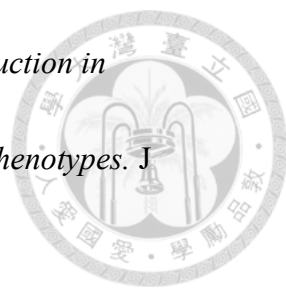


- networks in the bacterium Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem, 2017. **292**(38): p. 15691-15704.
52. Stewart, L.J., et al., *Handling of nutrient copper in the bacterial envelope*. Metallomics, 2019. **11**(1): p. 50-63.
53. Liu, M.C., et al., *New aspects of RpoE in uropathogenic Proteus mirabilis*. Infect Immun, 2015. **83**(3): p. 966-77.
54. Pannen, D., et al., *Interaction of the RcsB Response Regulator with Auxiliary Transcription Regulators in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2016. **291**(5): p. 2357-70.
55. Bijlsma, I.G.W., et al., *Nucleotide sequences of two fimbrial major subunit genes, pmpA and ucaA, from canine-uropathogenic Proteus mirabilis strains*. Microbiology (Reading), 1995. **141** (Pt 6): p. 1349-1357.
56. Scavone, P., et al., *Fimbriae have distinguishable roles in Proteus mirabilis biofilm formation*. Pathog Dis, 2016. **74**(5).
57. Armbruster, C.E., H.L.T. Mobley, and M.M. Pearson, *Pathogenesis of Proteus mirabilis Infection*. EcoSal Plus, 2018. **8**(1).
58. Li, X., et al., *Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonization factor of uropathogenic Proteus mirabilis*. Mol Microbiol, 2002. **45**(3): p. 865-74.

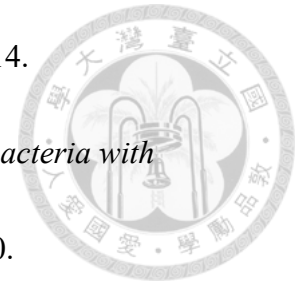
- 
59. Lewis, K., *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 48-56.
60. Keren, I., et al., *Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004. **186**(24): p. 8172-80.
61. Shah, D., et al., *Persisters: a distinct physiological state of E. coli*. BMC Microbiol, 2006. **6**: p. 53.
62. Sivick, K.E., et al., *The innate immune response to uropathogenic Escherichia coli involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2065-75.
63. Jenab, A., R. Roghanian, and G. Emtiazi, *Bacterial Natural Compounds with Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties (Mini Review)*. Drug Des Devel Ther, 2020. **14**: p. 3787-3801.
64. Cheng, N., et al., *Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury*. EMBO Rep, 2018. **19**(10).
65. Owusu-Boaitey, N., et al., *Macrophagic control of the response to uropathogenic E. coli infection by regulation of iron retention in an IL-6-dependent manner*. Immun Inflamm Dis, 2016. **4**(4): p. 413-426.
66. Hesse, C.C., B. Andersson, and A.E. Wold, *Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human*



- monocytes*. Cytokine, 2005. **30**(6): p. 311-8.
67. Pal, R.R., et al., *Genetic components of stringent response in Vibrio cholerae*. Indian J Med Res, 2011. **133**(2): p. 212-7.
68. Dalebroux, Z.D., R.L. Edwards, and M.S. Swanson, *SpoT governs Legionella pneumophila differentiation in host macrophages*. Mol Microbiol, 2009. **71**(3): p. 640-58.
69. Guo, Y., et al., *Resistance to oxidative stress by inner membrane protein ElaB is regulated by OxyR and RpoS*. Microb Biotechnol, 2019. **12**(2): p. 392-404.
70. Pérez Audero, M.E., et al., *Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors*. Mol Microbiol, 2010. **78**(4): p. 853-65.
71. Humbert, M.V., et al., *Protein signatures that promote operator selectivity among paralog MerR monovalent metal ion regulators*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20510-9.
72. Changela, A., et al., *Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR*. Science, 2003. **301**(5638): p. 1383-7.
73. Chen, K., et al., *An atypical linear Cu(I)-S2 center constitutes the high-affinity metal-sensing site in the CueR metalloregulatory protein*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(40): p. 12088-9.

- 
74. De Wulf, P. and E.C. Lin, *Cpx two-component signal transduction in Escherichia coli: excessive CpxR-P levels underlie CpxA* phenotypes*. J Bacteriol, 2000. **182**(5): p. 1423-6.
75. Snyder, W.B., et al., *Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway*. J Bacteriol, 1995. **177**(15): p. 4216-23.
76. Simpson, B.W. and M.S. Trent, *Emerging Roles for NlpE as a Sensor for Lipoprotein Maturation and Transport to the Outer Membrane in Escherichia coli*. mBio, 2019. **10**(3).
77. Danese, P.N. and T.J. Silhavy, *The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in Escherichia coli*. Genes Dev, 1997. **11**(9): p. 1183-93.
78. DiGiuseppe, P.A. and T.J. Silhavy, *Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system*. J Bacteriol, 2003. **185**(8): p. 2432-40.
79. Danese, P.N., et al., *The Cpx two-component signal transduction pathway of Escherichia coli regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP*. Genes Dev, 1995. **9**(4): p. 387-98.
80. Dorel, C., P. Lejeune, and A. Rodrigue, *The Cpx system of Escherichia coli, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling*

- biofilm communities?* Res Microbiol, 2006. **157**(4): p. 306-14.
81. Jin, X. and J.S. Marshall, *Mechanics of biofilms formed of bacteria with fimbriae appendages*. PLoS One, 2020. **15**(12): p. e0243280.
82. Chen, H.H., et al., *A CpxR-Regulated zapD Gene Involved in Biofilm Formation of Uropathogenic Proteus mirabilis*. Infect Immun, 2020. **88**(7).
83. Wu, L.W., et al., *[Progress on the function and regulatory mechanisms of bacterial Cpx signal transduction system]*. Yi Chuan, 2021. **43**(8): p. 747-757.
84. Xie, X., et al., *RpoE is a Putative Antibiotic Resistance Regulator of Salmonella enteric Serovar Typhi*. Curr Microbiol, 2016. **72**(4): p. 457-64.
85. Filippova, E.V., et al., *Crystal structure of nonphosphorylated receiver domain of the stress response regulator RcsB from Escherichia coli*. Protein Sci, 2016. **25**(12): p. 2216-2224.
86. Higgins, S., et al., *Copper resistance genes of Burkholderia cenocepacia H111 identified by transposon sequencing*. Environ Microbiol Rep, 2020. **12**(2): p. 241-249.
87. Schätzle, H., et al., *Comparative Phenotypic Analysis of Anabaena sp. PCC 7120 Mutants of Porinlike Genes*. J Microbiol Biotechnol, 2021. **31**(5): p. 645-658.
88. Overgaard, M., et al., *Messenger RNA interferase RelE controls relBE*



transcription by conditional cooperativity. Mol Microbiol, 2008. **69**(4): p.

841-57.

