

糖基转移酶 WekO 参与禽致病性大肠杆菌感染和致病

高宇杰¹, 于纪棉², 张晓荟¹, 王温馨¹, 葛同鑫¹, 宋若菲¹, 许浩男¹,
傅丹丹¹, 宋厚辉¹, 程昌勇^{1*}, 韩月^{1*}

1 浙江农林大学 动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 动物健康互联网检测技术浙江省工程研究中心, 浙江省动物医学与健康管理国际科技合作基地, 同一健康和食品安全“一带一路”国际联合实验室, 中澳动物健康大数据分析联合实验室, 浙江 杭州

2 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波

高宇杰, 于纪棉, 张晓荟, 王温馨, 葛同鑫, 宋若菲, 许浩男, 傅丹丹, 宋厚辉, 程昌勇, 韩月. 糖基转移酶 WekO 参与禽致病性大肠杆菌感染和致病[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3630-3642.

GAO Yujie, YU Jimian, ZHANG Xiaohui, WANG Wenxin, GE Tongxin, SONG Ruofei, XU Haonan, FU Dandan, SONG Houhui, CHENG Changyong, HAN Yue. The glycosyltransferase WekO is involved in the infection and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3630-3642.

摘要:【目的】探讨糖基转移酶 WekO 基因对禽致病性大肠杆菌(avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC)生物学特性的影响。【方法】以 O₁ 血清型 APEC 为亲本株, 利用 Red 同源重组技术构建 *wekO* 基因缺失株($\Delta wekO$)和回补株($C\Delta wekO$)。通过硝酸银染色和蛋白质免疫印迹(Western blotting)分析细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)图谱及血清反应性。同时, 检测 $\Delta wekO$ 的生长速率、运动能力, 并采用结晶紫染色法评估其生物被膜形成能力。此外, 利用鸡成纤维细胞(DF-1)测定 $\Delta wekO$ 的体外黏附和侵袭能力, 并以萧山蛋鸡为动物模型评估其致病力。【结果】成功构建了缺失株 $\Delta wekO$ 和回补株 $C\Delta wekO$; 与野生株相比, $\Delta wekO$ 的 LPS 图谱不完整, O-抗原梯状条带缺失, 且与 O₁ 血清无反应。在生长速率方面, $\Delta wekO$ 与野生株无显著差异($P>0.05$), 但其运动能力和生物被膜形成能力显著降低($P<0.001$), 对 DF-1 细胞的黏附率显著降低($P<0.001$)、侵袭率显著降低($P<0.01$), 对 7 日龄雏鸡的致病力也显著降低($P<0.05$)。【结论】本研究表明, *wekO* 基因缺失导致 APEC 的 O-抗原合成受阻, 进而影响 LPS 的完整性。此外, *wekO* 基因缺失还导致细菌的鞭毛形成和生物被膜构建能力丧失, 致病力显著下降。这些结果对于深入理解参与 APEC O-抗原合成的糖基转移酶的生物学功能具有重要意义。

关键词: 禽致病性大肠杆菌; 脂多糖; O-抗原; 糖基转移酶; 致病

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1801000); 国家自然科学基金(32473033); 浙江省自然科学基金(LQ24C010005)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1801000), the National Natural Science Foundation of China (32473033), and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LQ24C010005).

*Corresponding authors. E-mail: HAN Yue, yuehan@zafu.edu.cn; CHENG Changyong, lamge@zafu.edu.cn

Received: 2025-01-17; Accepted: 2025-02-19; Published online: 2025-05-14

The glycosyltransferase *WekO* is involved in the infection and pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*

GAO Yujie¹, YU Jimian², ZHANG Xiaohui¹, WANG Wenxin¹, GE Tongxin¹, SONG Ruofei¹, XU Haonan¹, FU Dandan¹, SONG Houhui¹, CHENG Changyong^{1*}, HAN Yue^{1*}

¹ Key Laboratory of Applied Biotechnology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, Zhejiang Engineering Research Center for Animal Health Diagnostics & Advanced Technology, Zhejiang International Science and Technology Cooperation Base for Veterinary Medicine and Health Management, the Belt and Road International Joint Laboratory for One Health and Food Safety, China-Australia Joint Laboratory for Animal Health Big Data Analytics, College of Veterinary Medicine of Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang, China

² Ningbo College of Health Sciences, Ningbo, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] To study the effects of the glycosyltransferase *WekO* involved in O-antigen synthesis on the biological characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **[Methods]** The mutant strain $\Delta wekO$ of APEC O₁ was constructed by Red homologous recombination, and the complementary strain $C\Delta wekO$ was then constructed. The lipopolysaccharide (LPS) profile of each strain was identified by silver staining. Simultaneously, the growth rate and swimming motility were measured. The reactivity of each strain with rabbit anti-O₁ serum was determined by Western blotting. The ability of $\Delta wekO$ to form biofilms was measured by the crystal violet staining method. DF-1 cells were used to evaluate the adhesion and invasion of $\Delta wekO$ *in vitro*. Subsequently, chicks were selected as an animal model to evaluate the pathogenicity of $\Delta wekO$. **[Results]** The mutant strain $\Delta wekO$ and the complementary strain $C\Delta wekO$ were constructed. The LPS profile of $\Delta wekO$ was incomplete compared with that of the wild-type strain. The mutant lacked O-antigen bands and showed no reactivity to anti-O₁ serum. There was no significant difference in growth rate between different strains ($P>0.05$). However, the motility and biofilm formation capabilities of $\Delta wekO$ decreased ($P<0.001$). Additionally, $\Delta wekO$ demonstrated weakened adhesion to DF-1 cells ($P<0.001$) and demonstrated weakened invasion to DF-1 cells ($P<0.01$). Also, $\Delta wekO$ reduced pathogenicity to 7-day-old chicks ($P<0.05$). **[Conclusion]** The deletion of *wekO* results in impaired O-antigen synthesis, incomplete LPS profile, loss of flagellar and biofilm formation capabilities, and reduced pathogenicity of APEC. These findings are highly significant for improving the understanding of the role of glycosyltransferases involved in APEC O-antigen synthesis.

Keywords: avian pathogenic *Escherichia coli*; lipopolysaccharide; O-antigen; glycosyltransferase; pathogenicity

禽致病性大肠杆菌是一种肠道外致病性大肠杆菌(extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, ExPEC), 感染该菌可引起禽大肠杆菌病, 导致

家禽肝周炎、气囊炎、心包炎、腹膜炎、关节炎等多种疾病^[1]。APEC 可感染各年龄段的多种家禽^[2]。4–6 周龄的肉鸡更容易受到 APEC 感

染, 而蛋鸡在整个生长和产蛋期均会受到 APEC 的威胁, 尤其是在产蛋高峰期前后, 给养殖行业造成了严重的经济损失^[3]。禽致病性大肠杆菌与人尿道致病性大肠杆菌 (uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)、新生儿致脑膜炎大肠杆菌 (neonatal meningitis-causing *Escherichia coli*, NMEC) 在基因组上存在相似性, 可能会通过污染家禽产品进而导致人类尿道感染和脑膜炎, 具有公共卫生风险, 危害人类健康^[4-5]。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁外层的组成成分, 具有刺激宿主 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 引发炎症反应、抵抗抗生素杀伤等多种生物学功能^[6]。LPS 由 3 个组分组成: 脂质 A、核心多糖和 O-抗原^[7]。APEC 的血清型以 O-抗原结构的不同来分型^[8], 其中 O₁、O₂ 和 O₇₈ 血清型常从全球鸡大肠杆菌感染中分离出来^[9]。O-抗原是革兰氏阴性菌的重要毒力因子^[10], 其结构不完整或缺失会导致许多病原体对血清的敏感性增高以及致病力降低^[11]。此外, O-抗原可以在细菌表面形成一层保护性屏障^[12], 帮助细菌抵抗宿主免疫系统的攻击^[13], 尤其是对补体系统的抵抗能力。这种抗补体作用能够增强细菌在宿主内的存活率, 从而提高细菌的毒力^[14]。

O-抗原合成的基因通常以基因簇的形式存在于基因组中^[15]。在大多数大肠杆菌和志贺氏菌中, O-抗原基因簇位于 2 个管家基因 *galF* 和 *gnd* 之间^[16]。APEC O₁ 血清型的 O-抗原基因簇由 *galF-rmlB-rmlD-rmlA-rmlC-wzx-mnaA-fdtC-wekM-wzy-wekN-wekO-gnd* 编码^[17]。本研究前期通过生物信息学分析发现, *wekO* 基因编码一种糖基转移酶, 该酶负责催化甘露糖(β -L-ManNAc)和鼠李糖(β -D-GlcNAc)形成二糖[β -D-ManNAc-(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rha]。然而, *wekO* 基因在 APEC O₁ 中的作用尚未明确。因此, 本研究聚焦于 *wekO* 基因的部分生物学功能, 进一步完善糖基转移酶在 APEC O₁ 中的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DF-1 细胞及质粒 pKD46 (30 °C 培养, 氨苄霉素抗性)、pKD3 (37 °C 培养, 氯霉素抗性)、pCP20 (30 °C 培养, 氨苄霉素抗性)、pSTV28 (37 °C 培养, 氯霉素抗性) 均由本实验室保存; 高保真 PCR 扩增酶 (KOD One PCR Master Mix) 和 DNA 连接酶 (ligation high v2) 购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 高纯度质粒小提中量试剂盒购自上海惠凌生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam* H I 购自 New England Biolabs 公司; 大肠杆菌 O₁ 血清型诊断血清购自天津生物芯片技术有限责任公司; DF-1 细胞培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自苏州依科赛生物科技股份有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、大肠杆菌 DH5 α 感受态均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 试验动物萧山鸡购自杭州萧山种鸡 (萧山鸡) 有限公司。本研究动物实验经浙江农林大学实验动物伦理委员会审核, 伦理编号为 ZAFUC202477。

1.2 引物设计

本研究基于 GenBank 数据库收录的 APEC O₁ 全基因组序列 (登录号: GCF_902880315.1), 以及质粒 pKD3 和 pSTV28 序列设计引物。其中, *wekO* 基因上下游同源臂分别使用 *wekO*-UF/UR 和 *wekO*-DF/DR 引物对进行扩增, pKD3 质粒的氯霉素抗性基因片段通过 *wekO*-CF/CR 引物对进行扩增。基因敲除株使用 *wekO*-outF/outR 引物对进行验证, *wekO* 基因启动子区使用 P*wekO*-*Kpn* I-F/P*wekO*-R 引物对进行扩增, *wekO* 基因编码区 (coding DNA sequence, CDS) 使用 *wekO*-F1/*wekO*-*Bam* H I-R 引物对进行扩增。此外, P*wekO*-*Kpn* I-F/*wekO*-*Bam* H I-R 引物对用于启动子区与编码区的融合扩增, 回补质粒使用

M13-F/R 引物对进行鉴定, 回补株使用 *wekO*-inF/inR 引物对进行验证。本研究所用引物序列如表 1 所示。

1.3 APEC O₁ 基因组提取

吸取 OD₆₀₀ 为 0.8 的 APEC O₁ 菌液 2 mL, 按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 APEC O₁ 基因组。基因组提取完成后使用多功能酶标仪检测浓度, 并将基因组用于试验或置于 -20 °C 冰箱保存。

1.4 *wekO* 基因缺失菌株构建

根据 Red 同源重组原理构建 *wekO* 基因缺失株^[18]。以 APEC O₁ 基因组为模板, 扩增 *wekO* 基因上下游同源臂(约 500 bp), 以 pKD3 质粒为模板, 扩增氯霉素抗性基因(约 1 000 bp)。按照表 1 中引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系(50 μL): KOD One PCR Master Mix 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 20 s, 35 个循环; 68 °C 终延伸

5 min。将上述 3 个片段进行 Overlap PCR, 获得 *wekO* upstream-chloramphenicol fragment-*wekO* downstream 融合片段。第 2 次 PCR 反应体系(50 μL): KOD One PCR Master Mix 25 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2.5 μL, 3 个片段 DNA 模板各 1 μL, ddH₂O 17 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 5 s, 68 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 68 °C 终延伸 5 min。将该融合片段纯化回收后, 电转化至 APEC O₁ (pKD46)感受态细胞中, 通过同源重组将氯霉素抗性片段替代 *wekO* 基因, 并通过氯霉素抗性筛选阳性克隆。将阳性克隆传代纯化后制备感受态, 电转化 2 μg pCP20 质粒以消除氯霉素抗性片段, 并通过氨苄霉素抗性筛选缺失株。经 37 °C 传代纯化后获得缺失株, 命名为 Δ*wekO*。

1.5 *wekO* 基因回补菌株构建

以 APEC O₁ 基因组为模板, 扩增 *wekO* 基因启动子和 CDS 序列。将启动子和 CDS 片段进行 Overlap PCR 扩增, 参照表 1 中引物扩增

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers name	Primer sequences (5'→3')
<i>wekO</i> -outF	GATGTTGAGCGCAAGGTTGC
<i>wekO</i> -outR	GGCTTGTAATTGAGGGCCTT
<i>wekO</i> -inF	CCAGCCGAATGACCATGTAT
<i>wekO</i> -inR	GCAGAGCATTGCGTATGAC
<i>wekO</i> -UF	GGTCAGGATTGGTGCAACCA
<i>wekO</i> -UR	CAGCCGTAAATTAGGTGTCTCTGGCACGAAAAT
<i>wekO</i> -CF	GACACCTAATTTAACGGCTGACATGGGAAT
<i>wekO</i> -CR	TTAACAAGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
<i>wekO</i> -DF	CAGCCTACACATCTTGTTAAATTTCAACTAATGT
<i>wekO</i> -DR	GCAGCATCAGAAAATGTCAGCG
M13-F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
P <i>wekO</i> -Kpn I-F	CGGGGTACCTCGTTGTTATTCTGATTGTT
P <i>wekO</i> -R	GCAATTTTTTTCATTGAAAATCTGACCGG
<i>wekO</i> -F1	CAGATTTTCAATGAAAAAATTGCTATTATCGG
<i>wekO</i> -BamH I-R	CGCGGATCCTTAATAGCAATCCTCATACAT

DNA 片段。PCR 反应体系(50 μL): KOD One PCR Master Mix 25 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2.5 μL , 启动子和 CDS 序列 DNA 模板各 1 μL , ddH₂O 18 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。使用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*HI 对融合片段及 pSTV28 载体进行双酶切。酶切产物纯化后, 使用 ligation high v2 进行连接。将连接产物热转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 通过氯霉素抗性筛选阳性质粒。提取阳性质粒后, 获得回补质粒 pSTV28-*wekO*。将 2 μg 回补质粒电转化至 ΔwekO 缺失株感受态中, 经 PCR 验证与测序鉴定后获得 *wekO* 回补菌株, 命名为 C ΔwekO 。验证时的 PCR 反应体系(20 μL): KOD One PCR Master Mix 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 8 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min。

1.6 细菌 LPS 图谱分析及与 O₁ 血清 Western blotting 特异性鉴定

参考文献[19]方法制备细菌 LPS 样品。吸取 OD₆₀₀ 为 0.8 的各菌株菌液 2 mL, 转移至无菌 EP 管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。用无菌 1 $\times$ PBS 洗涤 2 次后, 加入 150 μL 菌体裂解液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。待样品冷却至室温后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 30 μL 上清、270 μL 上样缓冲液和 3 μL 蛋白酶 K 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床酶解蛋白 1 h, 获得各菌株 LPS 样品, 可上样电泳或置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用硝酸银染色法检测各菌株的 LPS 图谱。首先, 采用 SDS-PAGE 技术对上述 LPS 样品进行分离电泳。电泳完成后, 将分离胶置于固定溶液中, 室温下缓慢振荡固定 4 h。用 ddH₂O 振荡洗涤 15 min, 重复 3 次。随后, 使用高碘酸溶液室温摇床振荡氧化反应 7 min, ddH₂O 振荡洗涤 15 min, 重复 3 次。使

用银染液室温摇床振荡着色 10 min, ddH₂O 振荡洗涤 15 min, 重复 3 次。最后, 加入适量显色液, 缓慢振荡直至出现黑色条带, 记录并拍摄实验结果。同时, 将 SDS-PAGE 胶进行转膜, 使用 Western blotting 方法检测各菌株 LPS 与大肠杆菌 O₁ 血清型 O 因子诊断血清的特异性反应。

1.7 细菌生长和运动能力测定

吸取 OD₆₀₀ 为 0.8 的各菌株菌液 150 μL , 转接至 15 mL LB 液体培养基中, 混合均匀后吸取 200 μL 测量 OD₆₀₀ 并记录数值(记为 0 h)。将菌液置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养, 每间隔 1 h 测量 OD₆₀₀ 并记录数值, 直至 12 h, 绘制各菌株生长曲线。将 1 μL OD₆₀₀ 约为 0.8 的各菌液穿刺至半固体培养基中(穿刺深度约为培养基深度的 1/3-2/3), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中分别静置培养 6 h 和 12 h。测量每个菌株的运动圈直径并扫描平板, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理和统计学分析, 以评估各菌株运动能力的差异。此外, 对 APEC O₁、 ΔwekO 和 C ΔwekO 单菌落进行醋酸铀染色后, 放置在铜网上干燥 30 min, 然后在透射电镜(transmission electron microscope, TEM)下观察并拍摄鞭毛结构。

1.8 细菌生物被膜形成能力测定

采用结晶紫染色法测定细菌的生物被膜形成能力^[20]。吸取 OD₆₀₀ 为 0.8 的各菌株菌液 20 μL , 加入至含有 180 μL 无菌 LB 的 96 孔聚丙烯板中, 并设置无菌 LB 作为阴性对照。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中, 分别静置培养 24 h 和 48 h 后, 弃去 96 孔聚丙烯板中的菌液, 使用无菌 1 $\times$ PBS 轻微吹打洗涤 3 次, 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱风干。随后, 各孔加入 200 μL 0.1% 结晶紫进行染色 30 min, 使用无菌 1 $\times$ PBS 洗涤至无结晶紫残留。放置 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱固定生物被膜 30 min 后, 每孔加 200 μL 95% 乙醇振荡 15 min, 测定各孔 OD₅₉₅ 值。最后, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据处理和统计学分析, 以评估各菌株生物被膜

形成的差异。

1.9 细菌黏附与入侵能力测定

参考文献[21]方法进行细胞感染试验。当 DF-1 细胞在 12 孔细胞板中生长至均匀单层(细胞密度约为 4×10^5 个/孔)时, 首先使用 37 °C 无菌 1×PBS 洗涤 3 次, 加入 1 mL 不含血清的 DMEM (含有 4×10^7 CFU/mL 的各细菌), 确保感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 100:1, 每组做 3 个重复。将 DF-1 细胞置于 37 °C 培养箱中感染 2 h 后, 移除原培养基。随后使用 37 °C 的无菌 1×PBS 缓冲液轻微洗涤 3 次, 以去除未附着的细菌。向每孔加入 1 mL 含 0.5% Triton X-100 的细胞裂解液, 在 4 °C 静置裂解 10 min。最后, 冰上反复吹打破碎细胞, 将裂解液稀释 10^3 倍, 梯度点板细菌计数, 计算黏附率, 如公式(1)所示。

$$\text{黏附率} = (a/c) \times 100\% \quad (1)$$

式中: a 为黏附细胞的细菌数, c 为初始感染细菌总数。

侵袭试验的细胞培养方法和感染比与黏附试验相同。细菌 37 °C 感染 2 h 后, 首先使用 37 °C 的无菌 1×PBS 缓冲液轻微洗涤 3 次, 每孔加入 1 mL DMEM 培养基和 2 μ L 50 mg/mL 庆大霉素, 继续培养 1 h 后使用 37 °C 的无菌 1×PBS 缓冲液轻微洗涤 3 次。随后向每孔加入 1 mL 含 0.5% Triton X-100 的细胞裂解液, 4 °C 静置裂解 10 min。最后, 冰上反复吹打破碎细胞, 将裂解液稀释 10^2 倍, 梯度点板细菌计数, 计算入侵率, 如公式(2)所示。

$$\text{入侵率} = (b/c) \times 100\% \quad (2)$$

式中: b 为入侵细胞的细菌数, c 为初始感染细菌总数。

1.10 对雏鸡致病力评估

参考文献[22]方法进行攻毒试验。选取 7 日龄萧山鸡共 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只。采用气囊注射方式分别感染 APEC O₁、 Δ *wekO* 和 C Δ *wekO* 3 组菌株, 每组每只注射 100 μ L

10^7 CFU/mL 的对应菌液, 对照组注射 100 μ L 无菌 1×PBS。攻毒后正常饲养 7 d, 观察并记录死亡情况, 整理数据绘制存活曲线, 评估缺失株的毒力变化。

1.11 统计分析

所有试验均进行 3 次生物学重复。试验结果使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行 *t*-test 统计学分析, 数据以平均值 $\pm$ SD 表示。ns 表示 $P > 0.05$, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。使用 Adobe Illustrator 2021 软件进行排版作图。

2 结果与分析

2.1 Δ *wekO* 缺失株和回补株的鉴定结果

为了研究 *wekO* 基因的部分生物学功能, 本研究构建了 *wekO* 基因缺失株和回补株。利用 Red 同源重组技术构建 *wekO* 基因缺失株, 使用 *wekO*-outF 与 *wekO*-outR 引物进行 PCR 扩增, 结果显示条带大小为 610 bp, 而 APEC O₁ 的条带大小为 1 384 bp, 成功构建了 Δ *wekO* (图 1A)。以 APEC O₁ 基因组为模板, PCR 扩增含启动子区域的 *wekO* 片段, 并将纯化的 PCR 片段与 pSTV28 质粒进行酶切连接。将构建成功的回补质粒电转化至 Δ *wekO* 感受态细胞中, 使用 *wekO*-inF 和 *wekO*-inR 引物进行鉴定, 野生株和回补株的条带大小均为 618 bp, 而缺失株未扩增出条带。经测序验证, 结果证符合预期, 成功构建了 C Δ *wekO* (图 1B)。

2.2 细菌 LPS 图谱分析及与 O₁ 因子血清反应特性鉴定

wekO 基因位于 APEC O₁ 的 O-抗原基因簇中, 负责单糖之间的连接。因此, 本研究使用硝酸银染色法鉴定各菌株的 LPS 图谱, 结果显示 *wekO* 缺失后 LPS 仅存在类脂 A 与单个短层 O 单元(图 2A)。这表明 *wekO* 缺失导致 O-抗原合成受阻, APEC O₁ 无法合成完整的 LPS。此外, 本研究还通过 Western blotting 检测各菌株

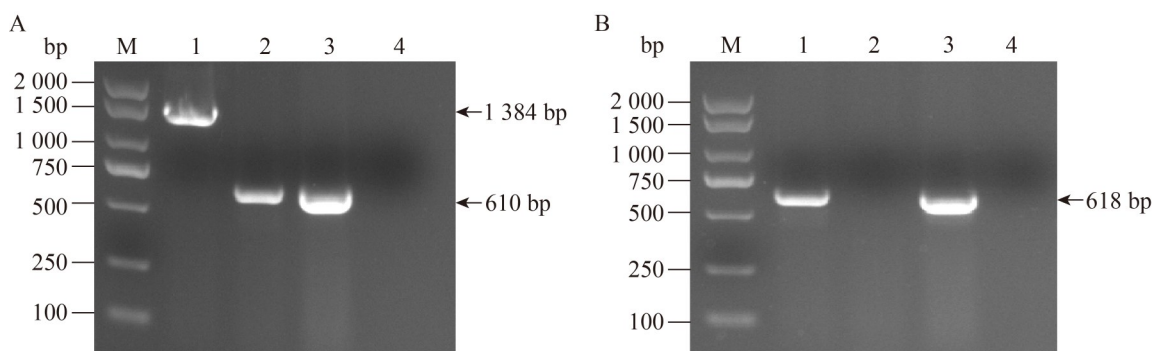


图1 PCR鉴定 $\Delta wekO$ 和 $C\Delta wekO$ 菌株。A: 使用 $wekO$ -outF/outR引物鉴定各菌株; B: 使用 $wekO$ -inF/inR引物鉴定各菌株。泳道M、1、2、3和4分别为DL2000 DNA marker、APEC O₁、 $\Delta wekO$ 、 $C\Delta wekO$ 和阴性对照(ddH₂O)。

Figure 1 PCR identification of $\Delta wekO$ and $C\Delta wekO$ strains. A: Identification of each strain with $wekO$ -outF/outR primers; B: Identification of each strain with $wekO$ -inF/inR primers. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: APEC O₁; Lane 2: $\Delta wekO$; Lane 3: $C\Delta wekO$; Lane 4: Negative control (ddH₂O).

的LPS与大肠杆菌O₁O因子血清的反应能力,结果显示 $\Delta wekO$ 不能与O₁O因子血清特异性结合(图2B),说明 $\Delta wekO$ 由于缺失O-抗原导致LPS与O₁血清不反应。上述结果表明 $wekO$ 基因参与O-抗原合成。

2.3 细菌生长和运动能力测定

通过测定细菌在LB培养基中12 h的 OD_{600} 值,绘制细菌生长曲线。结果表明, $wekO$ 基因缺失不影响APEC O₁在LB培养基中的生长($P>0.05$) (图3A)。运动能力检测表明,细菌培养6 h时,APEC O₁的运动圈直径为5.44 cm, $\Delta wekO$ 的运动圈直径为0.23 cm, $C\Delta wekO$ 的运动圈直径为4.95 cm;细菌培养12 h时,APEC O₁的运动圈直径为8.31 cm, $\Delta wekO$ 的运动圈直径为0.94 cm, $C\Delta wekO$ 的运动圈直径为7.13 cm (图3B)。统计学分析表明, $\Delta wekO$ 的运动能力相较于APEC O₁显著降低($P<0.001$) (图3C)。这说明 $wekO$ 基因在细菌运动能力的形成中起重要作用。

2.4 细菌鞭毛形成能力测定

本研究通过醋酸铀染色,利用透射电镜观察细菌鞭毛的形成情况。结果显示,在37℃条

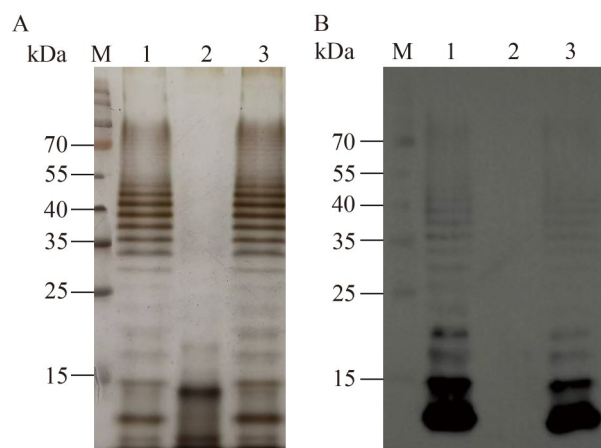


图2 LPS图谱分析(A)及Western blotting鉴定血清的反应能力(B)。A: 硝酸银染色法分析各菌株LPS图谱; B: Western blotting鉴定各菌株与O₁因子血清反应特性。泳道M、1、2和3分别为180 kDa蛋白marker、APEC O₁、 $\Delta wekO$ 和 $C\Delta wekO$ 菌株。

Figure 2 LPS spectrum analysis (A) and Western blotting identification of the reaction ability of serum (B). A: The LPS map of each strain was analyzed by silver nitrate staining method; B: The seroreactivity of each strain against O₁ antigen was assessed by Western blotting. Lane M: 180 kDa protein marker; Lane 1: APEC O₁; Lane 2: $\Delta wekO$; Lane 3: $C\Delta wekO$.

件下静置培养 12 h 后, $\Delta wekO$ 菌株未观察到鞭毛, 而野生株和回补株则可观察到明显的鞭毛形态(图 4)。这表明, $wekO$ 基因缺失导致鞭毛合成受阻, 进而使 $\Delta wekO$ 菌株的运动能力丧失。

2.5 细菌生物被膜形成能力测定

通过结晶紫染色法测定各菌株的生物被膜

形成能力。结果显示, 在培养 24 h 和 48 h 后, 96 孔板内各菌株的生物被膜染色深浅不一, 其中 $\Delta wekO$ 的颜色最浅, 依次为 $C\Delta wekO$ 和 APEC O_1 (图 5A)。各菌株的 OD_{595} 吸光值从低到高依次为 $\Delta wekO$ 、 $C\Delta wekO$ 和 APEC O_1 (图 5B)。统计学分析表明, $\Delta wekO$ 的生物被膜形成能力

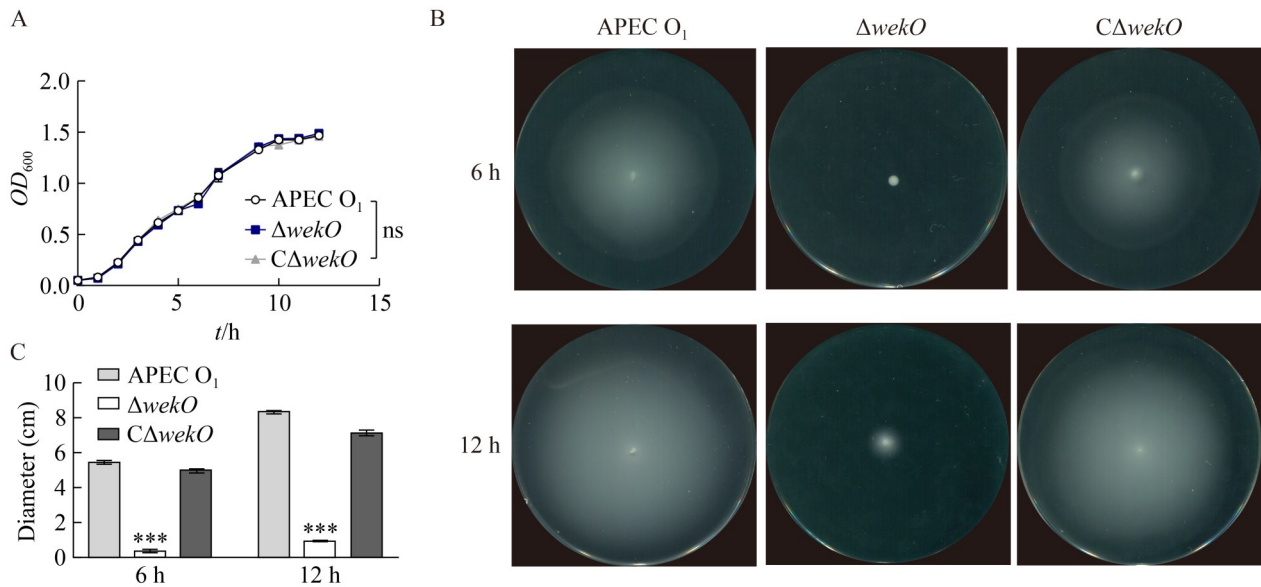


图3 APEC O_1 、 $\Delta wekO$ 和 $C\Delta wekO$ 的生长(A)、运动(B)能力检测及运动能力差异性分析(C)。A: 各菌株 12 h 生长能力测定; B: 各菌株 6 h、12 h 运动能力测定; C: 各菌株运动菌圈直径大小差异分析。

Figure 3 Detection of bacterial growth curves (A) and swimming motility (B) of APEC O_1 , $\Delta wekO$, and $C\Delta wekO$ and difference analysis of swimming motility (C). A: The growth ability of each strain was measured for 12 h (ns: $P>0.05$); B: Determination of 6 h and 12 h swimming motility of each strain; C: Analysis of the difference in the diameter of the moving bacteria circle of each strain (***: $P<0.001$).

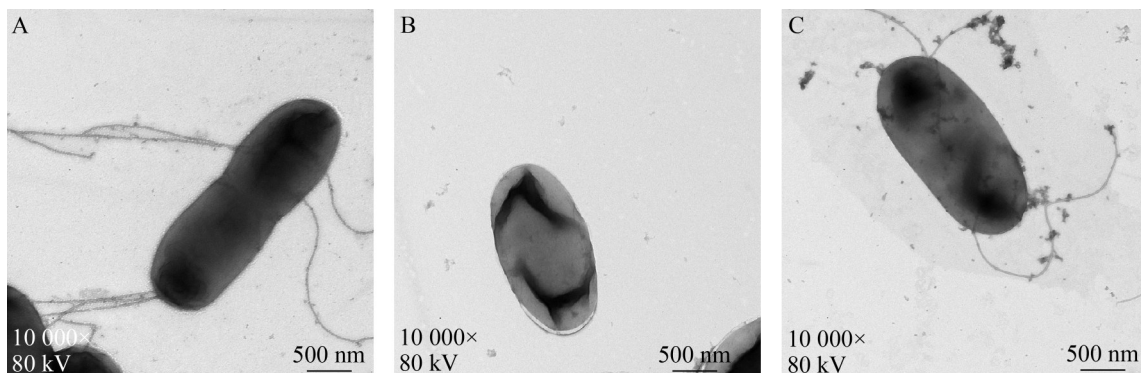


图4 透射电镜观察APEC菌株 O_1 (A)、 $\Delta wekO$ (B)和 $C\Delta wekO$ (C)鞭毛形态

Figure 4 Observation of flagellar morphology of APEC O_1 (A), $\Delta wekO$ (B), and $C\Delta wekO$ (C) by TEM.

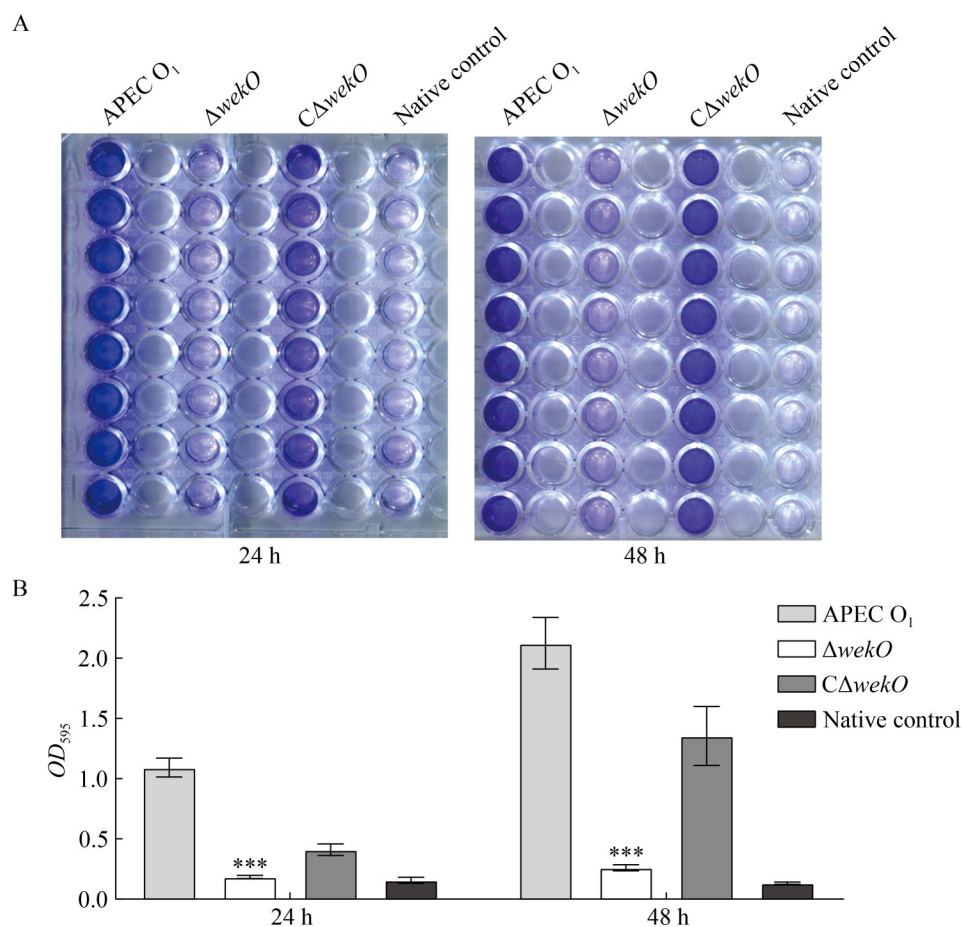


图5 APEC O₁、 $\Delta wekO$ 和C $\Delta wekO$ 菌株生物被膜生成能力检测(A)和差异性分析(B)。A: 各菌株在96孔板24 h和48 h内的生物被膜生成能力测定; B: 各菌株生物被膜结晶紫染色OD₅₉₅测定(***: $P < 0.001$)。

Figure 5 Detection of bacterial biofilm formation of APEC O₁, $\Delta wekO$, and C $\Delta wekO$ (A) and difference analysis (B). A: The biofilm formation ability of each strain in 96-well plates at 24 h and 48 h was determined; B: Determination of OD₅₉₅ of biofilm crystal violet staining of each strain (***: $P < 0.001$).

显著低于 APEC O₁ ($P < 0.001$), 而回补株则恢复至野生株水平。这说明 *wekO* 基因参与细菌生物被膜的形成。

2.6 细菌黏附与入侵能力测定

使用 DF-1 细胞评估 $\Delta wekO$ 菌株感染细胞的黏附与入侵能力。结果显示, $\Delta wekO$ 菌株感染 DF-1 细胞的黏附率较 APEC O₁ 下降 44.10% (图 6A), 侵袭率较 APEC O₁ 下降 26.33% (图 6B)。统计学分析表明, $\Delta wekO$ 菌株对 DF-1 细胞的黏附率显著低于 APEC O₁ ($P < 0.001$), 侵袭率显著低于 APEC O₁ ($P < 0.01$)。这说明 *wekO* 基因参与

细菌的黏附与入侵。

2.7 细菌对雏鸡毒力测定

将各菌株通过气囊接种至 1 周龄雏鸡体内, 观察并记录 7 d 内雏鸡的存活情况。当攻毒剂量为 10^7 CFU/mL 时, 攻毒野生株和回补株的雏鸡存活率均为 10%, 而 $\Delta wekO$ 菌株的存活率为 60%。与野生株相比, $\Delta wekO$ 菌株的毒力显著降低($P < 0.05$) (图 7)。

3 讨论与结论

APEC O₁ 是我国田间 APEC 的主要流行血

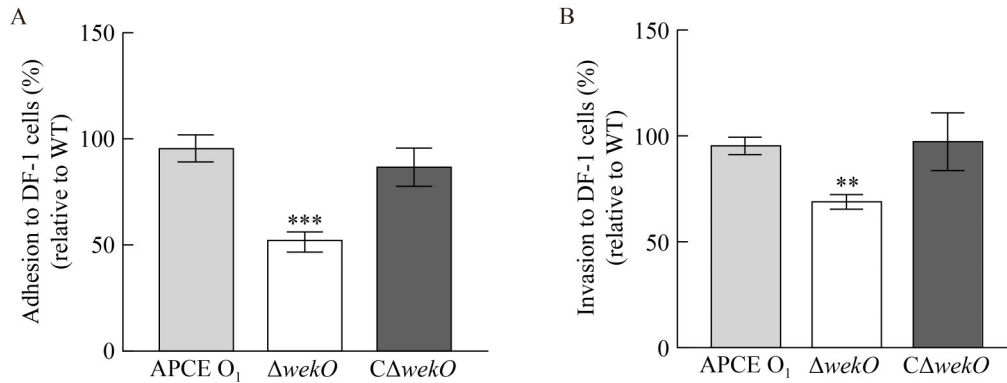


图6 APEC O₁、ΔwekO和CΔwekO菌株对DF-1细胞黏附(A)和侵袭(B)能力检测。A: 各菌株对DF-1细胞黏附能力测定(***: $P<0.001$); B: 各菌株对DF-1细胞侵袭能力测定(**: $P<0.01$)。

Figure 6 Detection of bacterial adhesion (A) and invasion (B) in DF-1 cells of APEC O₁, ΔwekO and CΔwekO. A: The adhesion ability of each strain to DF-1 cells was determined (***: $P<0.001$); B: The invasion ability of each strain to DF-1 cells was determined (**: $P<0.01$).

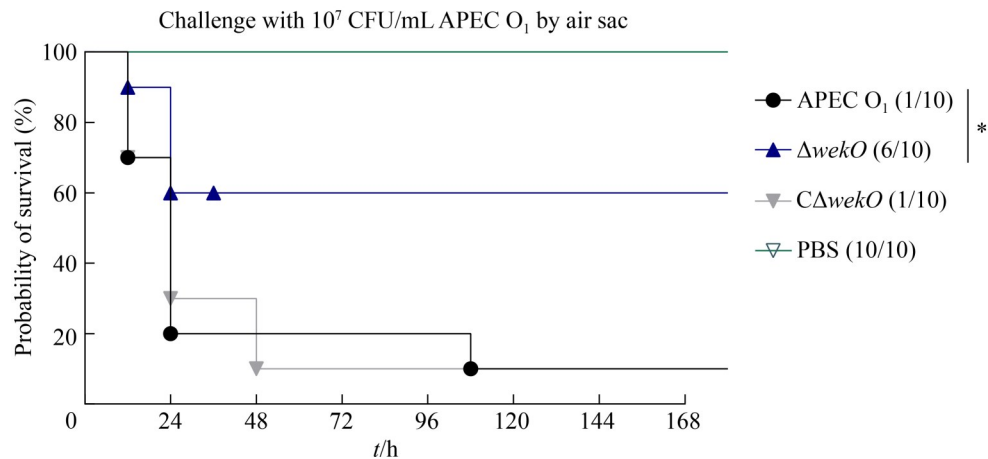


图7 APEC O₁、ΔwekO和CΔwekO菌株感染雏鸡的存活能力检测

Figure 7 Detection of the survival ability of chickens infected with APEC O₁, ΔwekO, and CΔwekO strains. *: $P<0.05$.

清型, 给家禽业带来了严重的经济损失^[23]。此外, 与其他血清型相比, APEC 与人类肠外致病性大肠杆菌基因组具有更高的相似性, 存在人畜共患的风险^[5]。近年来, APEC 对多种抗生素(包括碳青霉烯类等关键药物)表现出耐药性, 这使得治疗与防控工作变得更加困难^[3]。O-抗原位于细菌外膜, 是最先与药物或宿主相互作用的成分, 因此研究 APEC O₁ 的致病机制尤为重要。

O-抗原作为 LPS 的重要组成部分, 其合成需要一系列负责糖基合成和修饰的基因参与。已有研究报道, 缺失 *wzy* (O-抗原聚合酶)^[24] 和 *waaL* (O-抗原连接酶)^[25] 均会影响细菌表型和毒力。曹启予等^[26]发现, *wekM* (O-抗原糖基转移酶) 参与细菌 LPS 合成及其对环境的适应。作为同基因簇基因, *WekO* 基因注释与 *WekM* 一致, 但 *WekO* 负责 O-抗原中甘露糖与鼠李糖的连接。

本研究对 *wekO* 基因进行敲除, 分析突变株的部分生物学特性, 结果表明缺失 *wekO* 基因会影响细菌鞭毛形成能力、生物被膜形成能力、细胞黏附入侵能力和致病力。

wekO 位于 APEC O₁ O-抗原基因簇中, 因此本研究首先通过银染法分析该基因是否参与 O-抗原合成, 从而影响 APEC O₁ LPS 图谱的变化。结果显示, 缺失 *wekO* 后无法形成长链 O-抗原, LPS 仅存在核心多糖和短链 O 单元。通过 Western blotting 试验发现 $\Delta wekO$ 无法检测到 LPS 条带, 说明 $\Delta wekO$ 无法与 O₁ 型血清发生反应。上述结果表明, *wekO* 基因在形成完整 LPS 及与 O₁ 型血清反应中发挥了重要作用。缺失该糖基转移酶导致糖单元之间连接受阻, 进而影响 O-抗原的合成, 提示糖基转移酶 *WekO* 在 O-抗原合成中发挥重要作用, 但其参与 O-抗原合成过程的具体步骤及负责的糖基转移过程还有待进一步研究。

本研究结果显示, *wekO* 基因缺失导致细菌无法形成鞭毛, 进而使细菌几乎丧失了运动能力, 这与已知报道的大肠杆菌中 O-抗原的缺失在泳动和群集运动中均显示出显著缺陷^[27], 以及奇异变形杆菌中 O-抗原连接酶的缺失抑制了固体表面的群集运动^[28]相符。研究表明, LPS 突变可以通过荚膜多糖合成调控系统(regulation of capsular polysaccharide synthesis, Rcs)通路抑制鞭毛基因表达来损害细菌运动能力^[29]。由此推测, *wekO* 基因缺失可能导致 LPS 结构发生变化, 进而影响 Rcs 系统对 *flhDC* 相关鞭毛基因的表达。此外, 本研究结果还显示, *wekO* 基因缺失可以导致细菌几乎丧失生成生物被膜的能力。研究表明, 鞭毛在大肠杆菌生物被膜形成初始阶段发挥着重要作用^[30]。鞭毛介导的运动可以使附着、分裂的细菌沿着非生物表面传播, 寻找合适的生态位, 随后运动性被抑制, 细菌转化为静止状态并开始形成生物被膜^[31]。由此推测, *wekO* 基因缺失导致细菌失去运动能力, 从而显著影响其生物被膜的形成。

本研究还对体外细胞黏附和侵袭能力进行了评估。细胞感染试验结果显示, $\Delta wekO$ 对 DF-1 细胞的黏附率较 APEC O₁ 下降 44.10%, 侵袭率较 APEC O₁ 下降 26.33%, 说明 *wekO* 基因参与了细菌黏附侵袭宿主细胞的过程。细菌黏附和入侵宿主细胞的过程是介导微生物定殖和感染宿主发病的首要条件^[32]。细菌的黏附和侵袭与 O-抗原密切相关, 例如缺失 *wzy* 基因后 LPS 结构改变导致 APEC O₂ 黏附和入侵能力显著下降^[24]。由此推测, $\Delta wekO$ 可能是因为改变 LPS 的结构, 从而影响对宿主细胞的黏附和侵袭。同时, $\Delta wekO$ 感染天然宿主萧山蛋鸡的致病力较 APEC O₁ 降低, 说明 *wekO* 参与细菌毒力。由此推测, $\Delta wekO$ 黏附侵袭能力降低导致细菌致病力下降。

综上所述, 本研究针对 O-抗原糖基合成酶基因 *wekO* 缺失的部分生物学特性进行了研究, 结果显示 $\Delta wekO$ 的 LPS 图谱不完整, 无法形成鞭毛, 丧失了生物被膜形成能力, 细胞黏附侵袭能力下降, 细菌致病力降低。本研究进一步完善了 O-抗原合成相关基因的生物學功能。

作者贡献声明

高宇杰: 实验操作、论文撰写与修改; 于纪棉: 协助实验操作; 张晓芸: 协助实验数据分析; 王温馨: 协助实验操作; 葛同鑫: 协助数据收集; 宋若菲: 协助实验操作; 许浩男: 协助数据处理; 傅丹丹: 参与论文讨论; 宋厚辉: 提供试验场地; 程昌勇: 监督管理; 韩月: 获取基金、本论文的修订与审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] GUABIRABA R, SCHOUER C. Avian colibacillosis: still many black holes[J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(15): fnv118.

- [2] RONCO T, STEGGER M, OLSEN RH, SEKSE C, NORDSTOGA AB, POHJANVIRTA T, LILJE B, LYHS U, ANDERSEN PS, PEDERSEN K. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 13.
- [3] KATHAYAT D, LOKESH D, RANJIT S, RAJASHEKARA G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies[J]. Pathogens, 2021, 10(4): 467.
- [4] MELLATA M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2013, 10(11): 916-932.
- [5] JOHNSON TJ, KARIYAWASAM S, WANNEMUEHLER Y, MANGIAMELE P, JOHNSON SJ, DOETKOTT C, SKYBERG JA, LYNNE AM, JOHNSON JR, NOLAN LK. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(8): 3228-3236.
- [6] RAETZ CRH, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annual Review of Biochemistry, 2002, 71: 635-700.
- [7] SIMPSON BW, TRENT MS. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17(7): 403-416.
- [8] WANG M, LIU B, XU YL, GUO X, FU T, LIU JF, LIU B, WANG L. Characterization of the O-antigen gene clusters and development of a molecular serotyping method for *Vibrio fluvialis*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2022, 370: 109665.
- [9] DHO-MOULIN M, FAIRBROTHER JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)[J]. Veterinary Research, 1999, 30(2/3): 299-316.
- [10] VANACORE A, VITIELLO G, WANKE A, CAVASSO D, CLIFTON LA, MAHDI L, CAMPANERO-RHODES MA, SOLÍS D, WUHRER M, NICOLARDI S, MOLINARO A, MARCHETTI R, ZUCCARO A, PADUANO L, SILIPO A. Lipopolysaccharide O-antigen molecular and supramolecular modifications of plant root microbiota are pivotal for host recognition[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 277: 118839.
- [11] SARKAR S, ULETT GC, TOTSIKA M, PHAN MD, SCHEMBRI MA. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94786.
- [12] PITHER MD, ILLIANO A, PAGLIUCA C, JACOBSON A, MANTOVA G, STORNAIUOLO A, COLICCHIO R, VITIELLO M, PINTO G, SILIPO A, FISCHBACH MA, SALVATORE P, AMORESANO A, MOLINARO A, di LORENZO F. *Bacteroides thetaiotaomicron* rough-type lipopolysaccharide: the chemical structure and the immunological activity[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 297: 120040.
- [13] REEVES PP, WANG L. Genomic organization of LPS-specific loci[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2002, 264(1): 109-135.
- [14] ZHENG RC, LI W, YIN WJ, QIAO L, SONG SK, AN YN, LING ZR, BAI L, YANG H, SHEN JZ, DONG YJ, WANG Y. PETN-modified O-antigen enhances *Shigella* pathogenesis by promoting epithelial cell invasion and inhibiting complement binding[J]. ACS Infectious Diseases, 2024, 10(2): 377-383.
- [15] DELANNOY S, BEUTIN L, MARIANI-KURKDJIAN P, FLEISS A, BONACORSI S, FACH P. The *Escherichia coli* serogroup O1 and O2 lipopolysaccharides are encoded by multiple O-antigen gene clusters[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 30.
- [16] LIU B, FUREVI A, PEREPELOV AV, GUO X, CAO HC, WANG Q, REEVES PR, KNIREL YA, WANG L, WIDMALM G. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(6): 655-683.
- [17] WANG SH, MENG QM, DAI JJ, HAN XG, HAN Y, DING C, LIU HW, YU SQ. Development of an allele-specific PCR assay for simultaneous sero-typing of avian pathogenic *Escherichia coli* predominant O1, O2, O18 and O78 strains[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96904.
- [18] 李瑞娟, 赵晓雨, 杨润雨, 刘洋, 颜富, 王海龙, 张友明, 符军. 噬菌体重组酶介导的DNA同源重组工程[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3230-3248.
- LI RJ, ZHAO XY, YANG RY, LIU Y, YAN F, WANG HL, ZHANG YM, FU J. Recombineering mediated by bacteriophage recombinases[J]. Microbiology China, 2021, 48(9): 3230-3248 (in Chinese).
- [19] REZANIA S, AMIRMOZAFFARI N, TABARRAEI B, JEDDI-TEHRANI M, ZAREI O, ALIZADEH R, MASJEDIAN F, ZARNANI AH. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*[J]. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 2011, 3(1): 3-9.
- [20] HU JG, LV XL, NIU XP, YU FH, ZUO JK, BAO YL, YIN HF, HUANG CQ, NAWAZ S, ZHOU W, JIANG W, CHEN ZG, TU J, QI KZ, HAN XG. Effect of nutritional and environmental conditions on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(6): 4236-4251.
- [21] 李双阳, 张贝贝, 胡剑刚, 王欣宇, 祁晶晶, 田明星, 鲍衍清, 石玉祥, 王少辉. Tol-Pal 系统 *tolQ* 基因对禽致病性大肠杆菌生物学特性及毒力的影响[J]. 中国兽医科学, 2025, 55(1): 11-17.
- LI SY, ZHANG BB, HU JG, WANG XY, QI JJ, TIAN MX, BAO YQ, SHI YX, WANG SH. Tol-Pal system *tolQ* gene affects the biological characteristics and virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Chinese Veterinary Science, 2025, 55(1): 11-17 (in Chinese).
- [22] HAN XG, BAI H, TU J, YANG LJ, XU D, WANG SH, QI KZ, FAN GB, ZHANG YX, ZUO JK, TIAN MX, DING C, YU SQ. Deletion of *luxS* further attenuates the virulence of the avian pathogenic *Escherichia coli* AroA mutant[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 88: 39-47.
- [23] 陈娟桦. 禽致病性大肠杆菌基因组流行病学分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- CHEN XH. Research on the genomic epidemiology of the avian pathogenic *Escherichia coli*[D]. Nanjing:

- Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [24] ZUO JK, TU CT, WANG YL, QI KZ, HU JG, WANG ZH, MI RS, HUANG Y, CHEN ZG, HAN XG. The role of the *wzy* gene in lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 127: 296-303.
- [25] HAN Y, HAN XG, WANG SH, MENG QM, ZHANG YX, DING C, YU SQ. The *WaaL* gene is involved in lipopolysaccharide synthesis and plays a role on the bacterial pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 172(3/4): 486-491.
- [26] 曹启予, 高宇杰, 张晓芸, 陈歆丹, 罗平, 翟瑞东, 韩先干, 宋厚辉, 程昌勇, 于纪棉, 韩月. 糖基转移酶 *WekM* 参与禽致病性大肠杆菌脂多糖合成和环境适应[J]. *微生物学报*, 2024, 64(8): 2702-2712.
- CAO QY, GAO YJ, ZHANG XH, CHEN XD, LUO P, ZHAI RD, HAN XG, SONG HH, CHENG CY, YU JM, HAN Y. The glycosyltransferase *WekM* is involved in the lipopolysaccharide biosynthesis and environmental adaptation of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(8): 2702-2712 (in Chinese).
- [27] ZHOU XJ, LIU B, SHI CL, SHI XM. Mutation of a *Salmonella* serogroup-C1-specific gene abrogates O7-antigen biosynthesis and triggers NaCl-dependent motility deficiency[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106708.
- [28] MORGENSTEIN RM, CLEMMER KM, RATHER PN. Loss of the *WaaL* O-antigen ligase prevents surface activation of the flagellar gene cascade in *Proteus mirabilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(12): 3213-3221.
- [29] GIRGIS HS, LIU Y, RYU WS, TAVAZOIE S. A comprehensive genetic characterization of bacterial motility[J]. *PLoS Genetics*, 2007, 3(9): 1644-1660.
- [30] DRESSAIRE C, MOREIRA RN, BARAHONA S, ALVES de MATOS AP, ARRAIANO CM. *BolA* is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development[J]. *mBio*, 2015, 6(1): e02352-14.
- [31] PRATT LA, KOLTER R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili[J]. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 285-293.
- [32] HERNANDES RT, deLa CRUZ MA, YAMAMOTO D, GIRÓN JA, GOMES TAT. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(10): 3793-3802.