

# 基于 iTRAQ 方法分析副溶血弧菌活的非可培养状态的差异表达上调蛋白

田娟, 叶忱, 刘羽霏, 王丽, 钟青萍  
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 采用低温、寡营养和食品防腐剂处理诱导副溶血弧菌进入活的非可培养状态 (viable but nonculturable state, VBNC), 并利用同位素标记相对与绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)蛋白质组学技术分析处于 VBNC 状态和对数生长期的副溶血弧菌的差异表达蛋白, 结合液质联用技术对蛋白进行鉴定, 对差异蛋白进行 GO 富集分析和 Pathway 通路分析。结果表明, 副溶血弧菌于山梨酸钾浓度为 10 mmol/L 的 3% NaCl 寡营养培养基中, 4 °C 条件下 40~45 d 即可进入到 VBNC 状态。通过 iTRAQ 蛋白质组学技术共鉴定到 135880 个蛋白, 其中定量的蛋白有 1088 个; 在 VBNC 状态显著下调蛋白 36 个, 上调蛋白 15 个。差异表达的上调蛋白主要是外膜蛋白、转运蛋白、铁蛋白和其他参与代谢的关键蛋白, 表明 VBNC 状态的副溶血弧菌根据环境应激提高这些蛋白的表达以保持活性。该研究结果为更深入探讨 VBNC 的分子形成机制提供了理论基础。

**关键词:** 副溶血弧菌; iTRAQ; 活的非可培养状态; 差异蛋白

文章编号: 1673-9078(2015)8-53-58

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.010

## The Up-regulated Expressed Proteins of the Viable but Nonculturable State of *Vibrio parahaemolyticus* by iTRAQ

TIAN Juan, YE Chen, LIU Yu-fei, WANG Li, ZHONG Qing-ping

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** *Vibrio parahaemolyticus* was induced into viable but nonculturable (VBNC) state by food preservative at low temperature and oligotrophic condition. The aim of this study is to screen differentially expressed proteins of VBNC state and exponential phase of *V. parahaemolyticus* using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) combined with LC/MS. Functional annotations of unigenes were analyzed using protein sequence similarity, KEGG pathway and GO analysis. The results showed that only 40~45 days *V. parahaemolyticus* could induce into VBNC state at 4 °C in seawater containing 10 mmol/L potassium sorbate. A total of 135,880 proteins, including 1,088 unique proteins were identified. Of the quantitatively different proteins under the VBNC state, 15 were significantly up-regulated and 36 were down-regulated. The up-regulated expressed proteins were mainly focused on outer membrane protein, transporter proteins, ferritin and other key components involved in metabolism. This study provided basis for understanding the mechanism of adaptation of the VBNC state of *V. parahaemolyticus*.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; isobaric tags for relative and absolute quantitation; viable but nonculturable state; differential proteins

“蛋白质组”一词最早由澳大利亚学者 Wilkins 和 Williams 于 1994 年提出, 指“一种基因组所表达的全套蛋白质”, 即包括一种细胞乃至一种生物所表达的全部蛋白质<sup>[1]</sup>。蛋白质组在机体中是动态的, 研究蛋白质组在机体中的动态称为蛋白质组学 (proteomics), 其目的是比较细胞在不同处理条件下蛋白质表达的差异, 分析蛋白质的相互作用以及蛋白质

收稿日期: 2014-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271956)

作者简介: 田娟 (1989-), 女, 硕士在读, 研究方向: 食品微生物

通讯作者: 钟青萍 (1967-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全、食品微生物

的功能。蛋白质组学对基因表达的蛋白质水平进行定量的测定, 可解释基因表达调控的机制。iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) 技术是美国应用生物系统公司 (ABI) 推出的一项新的体外同位素标记技术<sup>[2]</sup>, 现在已经成为一种广泛应用的蛋白质组定量技术, 是差异蛋白质组学研究的重要工具之一, 使用该技术可以寻找差异表达蛋白, 并分析其蛋白功能, 同时可以对一个基因组表达的全部蛋白质或一个复杂的混合体系中的所有蛋白质进行精确定量和鉴定。

细菌“活的非可培养状态” (viable but nonculturable state, VBNC) 是细菌处于不良环境条件

下特殊的活的存在形式,目前已经发现至少 60 多种细菌能进入 VBNC 状态<sup>[3-4]</sup>。处于 VBNC 状态的病原菌,由于常规的培养方法不能检出,成为逃避检测的“隐性污染源”;而且由于其仍具有代谢活性,并保留原菌的毒力和致病性,在适宜的条件下,VBNC 细菌能够复苏,恢复生长繁殖,可重新对周围的环境及食品安全构成威胁,因此对于此种现象产生的分子机制的研究尤为重要。副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是引起食源性疾病的重要致病菌,可引发腹痛、腹泻、呕吐、急性肠胃炎和原发性败血症<sup>[5-6]</sup>。在我国,由副溶血弧菌引起的胃肠感染逐年上升,在某些沿海省市的比例甚至高达 60% 以上,已成为微生物性食源性疾病暴发之首,严重危害着公众健康。目前有关副溶血弧菌 VBNC 状态的生理生化表型和某些基因表达的研究已有一些报道<sup>[4]</sup>,并逐步进入到蛋白和基因水平的分子机理研究。本文利用 iTRAQ 技术定量分析活的可培养状态和处于对数期的副溶血弧菌的差异表达蛋白质,并深入分析上调表达的蛋白,为研究副溶血弧菌 VBNC 的分子形成机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

副溶血弧菌 ATCC 17802 保存于 -80 °C 冰箱中,取出后在 3% NaCl 牛肉膏蛋白胨固体培养基上活化,挑取单菌落在 2% NaCl 牛肉膏蛋白胨液体培养基中 30 °C 摇床培养 16 h。

### 1.2 副溶血弧菌 VBNC 的诱导与验证

将处于对数期的副溶血弧菌 5000 r/min 离心后的菌体用 3% NaCl 溶液洗涤 2 次并悬浮菌体,加入诱导培养基中使菌体的初始浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL。通过前期诱导条件的研究,确定此次的诱导条件为:山梨酸钾浓度为 10 mmol/L 的 3% NaCl 寡营养培养基,4 °C 低温放置。

在诱导过程中用涂布平板法检测活细菌数的变化,37 °C 恒温培养 24 h 后,观察平板上无菌落生长。开始每隔 3 d 取样涂板,10 d 后每隔 5 d 取样涂板。当平板上无菌落生长时,连续 3 d 加大接种量涂板,检测无活菌存在。然后参考文献方法<sup>[7]</sup>,用浓度为 3  $\mu$ g/mL 的叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)处理细菌后提取 DNA,选择副溶血弧菌的特异性基因 *tlh*,设计 PCR 引物,上游引物 5'-GTGCGAAGAACTTCATGTTG-3',下游引物 5'-GATGAGCGGTTGATGTCC-3',进行 PMA-PCR 检测验证副溶血弧菌进入

活的可培养状态。

### 1.3 活菌观察与计数

利用吖啶橙-荧光显微镜观察方法对不同状态的副溶血弧菌进行观察,活菌呈绿色荧光,死菌呈红色荧光。通过荧光显微镜观察计数菌液中的绿色荧光细胞。同时,根据本课题组建立的荧光定量 PMA-LAMP 方法对 VBNC 细菌进行定量,通过得到副溶血弧菌的标准曲线,确定 VBNC 状态细菌的数量。实验均设有 2 个重复。

### 1.4 蛋白提取、酶解及 iTRAQ 标记

采用丙酮沉淀法提取副溶血弧菌的蛋白,以 GE healthcare 的 2D-Quant Kit 定量试剂盒进行蛋白质定量。SDS-PAGE 电泳检测后,按照胰蛋白酶:蛋白=1:50 的比例 37 °C 酶解过夜,然后按照胰蛋白酶:蛋白=1:500 的比例再次加入胰蛋白酶 37 °C 酶解 4 h。抽干后使用 0.1% TFA 溶解肽段,除盐,抽干,使用 20  $\mu$ L 0.5 mol/L TEAB 重新溶解。标记试剂使用 80  $\mu$ L ACN 溶解;与溶解好的肽段充分混合;在室温下孵育 2 h,混合后进行反相色谱分离。

### 1.5 iTRAQ 标记多肽的反相色谱分离、串联质谱分析

使用 ThermoExtend C18 (5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm) 反相色谱柱对标记后的多肽进行液相分离。标记、混合后的样品抽干并使用 buffer A 复溶(10 mmol/L NH<sub>4</sub>COOH, 2% CAN, pH 10)。色谱分离的流速为 1 mL/min, buffer A 至 buffer B (10 mmol/L NH<sub>4</sub>COOH, 90% CAN, pH 10) 梯度洗脱,逐步提高 buffer B 的比例以使多肽依次被洗脱下来:5 min 内 buffer B 由 5% 上升至 8%,然后在 35 min 内上升至 18%,再在 20 min 内上升到 35%;然后 2 min 内使 buffer B 快速上升到 95%,保持 4 min 后再平衡到 5%。收集洗脱液后按需求合并组分并抽干待用。将抽干的组分用 buffer A (5% CAN, 0.1% FA) 复溶。每个组分上样约 4  $\mu$ g 蛋白,通过 ThermoFisher 的 Easy-nLC 1000 型号的液相色谱仪进行分离。经过液相分离的肽段进行串联 ESI 质谱仪分析。

### 1.6 生物信息学分析

质谱仪的数据用数据库(<http://www.matrixscience.com>)进行数据分析;域注释采用蛋白质 InterPro 域数据库(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导副溶血弧菌进入 VBNC

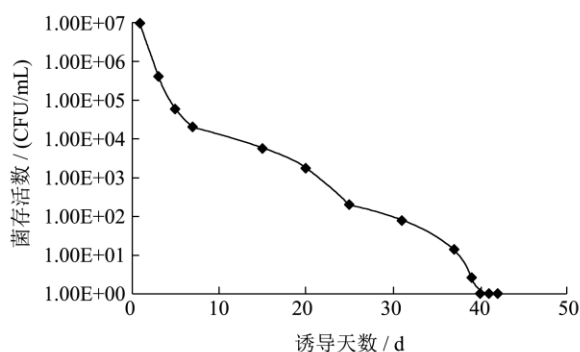


图 1 副溶血弧菌的诱导存活曲线

Fig.1 The survival curve of *V. parahaemolyticus*

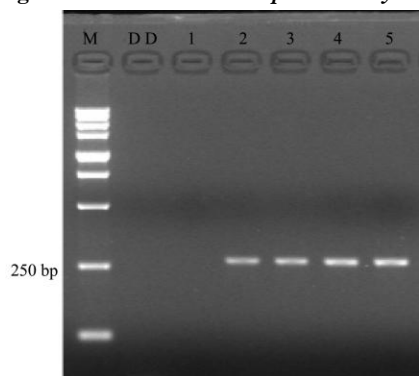


图 2 副溶血弧菌的 PMA-PCR 结果

Fig.2 The result of PMA-PCR of *V. parahaemolyticus*

注: M: DNA Ladder 5000; DD: 阴性对照; 1: 死菌 PMA+; 2: 死菌 PMA-; 3: 活菌 PMA+; 4: 活菌 PMA-; 5: VBNC 菌 PMA+

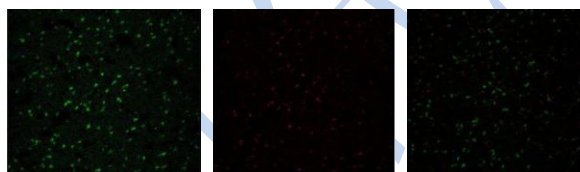


图 3 荧光显微镜下不同状态的副溶血弧菌

Fig.3 Morphological characteristics of *V. parahaemolyticus* in different states under fluorescence microscope

注: 由左至右分别是正常状态的细菌、死亡细菌、VBNC 状态的细菌。

通过涂布平板法计数, 在诱导过程中, 副溶血弧菌在前 10 d 的活菌数迅速降到  $10^4$  cfu/mL, 之后的下降趋于平缓, 到 40 d 时平板计数为 0, 此后连续 3 d 取样计数, 活菌数都为 0 (图 1)。PMA-PCR 结果显示, 活菌和 VBNC 状态的菌可得到特异性扩增条带, 而死菌经 PMA 处理后无 PCR 扩增条带 (图 2), 验证副溶血弧菌进入活的非可培养状态。结果表明山梨酸

钾浓度 10 mmol/L 结合 3% NaCl 寡营养、4 °C 条件下可诱导副溶血弧菌 ATCC 17802 进入 VBNC 状态, 诱导时间为 40~45 d。

图 3 显示的是利用吖啶橙-荧光显微镜方法对不同状态的副溶血弧菌的观察结果, 发现正常状态下细菌呈绿色, 而死菌呈红色, VBNC 状态的菌液中存在大量呈绿色荧光的活菌细胞。活菌细胞由诱导前的  $1 \times 10^8$  cfu/mL 降为  $2.5 \times 10^6$  cfu/mL。

### 2.2 蛋白质质量误差分析

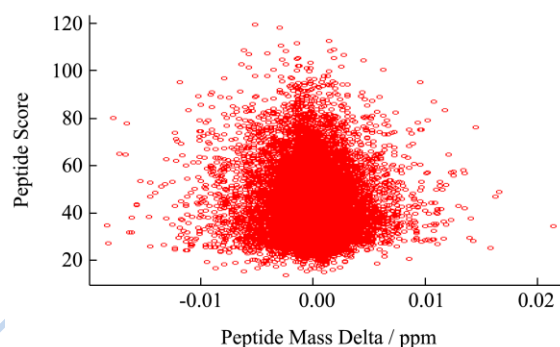


图 4 副溶血弧菌谱图匹配质量误差分布

Fig.4 The error distribution of the peptide spectra match quality of *V. parahaemolyticus*.

注: 横坐标: 肽段质量差异, 数量级 ppm; 纵坐标: Mascot 数据库离子评分。

图 4 是副溶血弧菌蛋白质组鉴定结果的质量误差分布, 即匹配到的肽段的相对分子量的实际值和理论值之间的误差分布, 谱图分布集中在 Mass delta=0 是最理想情况, 通常分布在 -20~20 即可接受。处于 VBNC 状态的副溶血弧菌和对照组的蛋白组鉴定结果显示, 误差分布集中在百万分之 0.01 之间, 鉴定结果比较理想。

### 2.3 蛋白质鉴定统计信息

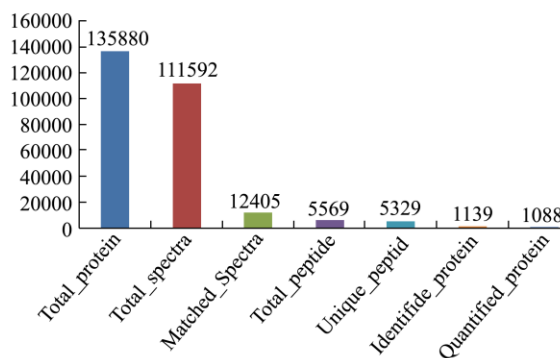


图 5 副溶血弧菌蛋白质基本鉴定信息统计图

Fig.5 The basic information chart of proteome identification in *V. parahaemolyticus*

通过液质联用鉴定得到总肽段 (Total peptide) 为 5569, 总蛋白 (Total protein) 为 135880, 其中定量的蛋白质 (Quantified protein) 为 1088 (图 5)。

### 2.4 差异蛋白筛选、分析

根据质谱数据分析差异蛋白, 图6显示可定量的所有蛋白质的差异倍数的分布情况, 其中横坐标表示差异倍数经过log2转化后的值, 大于0的为表达量上调, 小于0的为表达量下调。

依据蛋白质丰度水平, 当差异倍数达到 1.2 倍以上, 且经统计检验其 p-value 值小于 0.05 时, 视为差异表达蛋白, 结果显示 VBNC 状态和对数期的副溶血弧菌的差异蛋白总数为 51 个, 其中 36 个蛋白下调表达, 15 个蛋白上调表达。通过数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 找到不同蛋白质的结构域和功能, 查找到匹配蛋白的信息, 获得该蛋白的

名称和功能, 上调表达的蛋白见表 1。

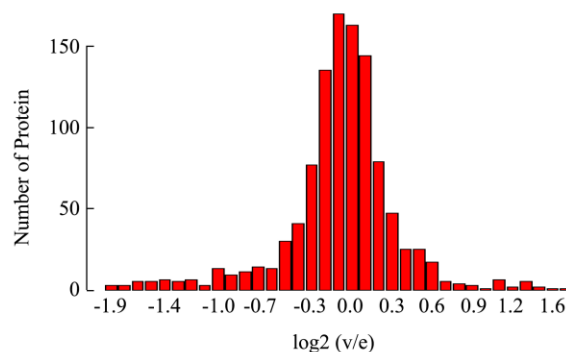


图 6 副溶血弧菌蛋白质丰度比分布图

Fig.6 Relative abundances of differentially expressed quantitative protein in *V.parahaemolyticus*

注: v 是 VBNC 状态的副溶血弧菌, e 是对数期的副溶血弧菌。

表 1 VBNC 状态副溶血弧菌差异上调表达的蛋白

Table 1 The up-regulated protein expression of the VBNC state of *V. parahaemolyticus*

Number	prot_acc	fold_change /(v/e)	p-value /(v/e)	Species	Accession	Protein	interPro_description
1	L0I2E0	1.98	0.00219	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I2E0_VIBPH	Aerobactin siderophore receptor IutA	依赖 TonB 的外膜 转运体
2	L0I6P2	1.63	0.01599	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I6P2_VIBPH	Vibrioferrin receptor PvuA	依赖 TonB 的外膜 转运体
3	W2BTX4	1.52	0.00030	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> EKP-008	W2BTX4_VIBPH	Choline ABC transporter, periplasmic binding family protein	甜菜碱运输系统, 底物结 合: 参与细菌渗透调节, 这个区域融合于转录合 成的透性酶的构件中
4	L0I452	1.39	0.02083	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I452_VIBPH	Ferric siderophore receptor PsuA	依赖 TonB 的外 膜转运体
5	T5FAM2	1.38	0.04928	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> VP2007-095	T5FAM2_VIBPH	HlyD secretion family protein	生物素附件, ATP 结合
6	L0HTP8	1.34	0.00116	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0HTP8_VIBPH	Glutamate synthase [NADPH] large chain	谷氨酸合成酶
7	L0I4N3	1.30	0.04565	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I4N3_VIBPH	Methylcrotonyl-CoA carboxy lase carboxyl transferase subunit	羧基转移酶
8	E1CRH8	1.23	0.00002	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Peru-466	E1CRH8_VIBPH	GTP cyclohydrolase II	保守假定蛋白 CHP02464, 大肠杆菌群 集能动性蛋白质 YbiA, 功能未知

转下页

接上页

9	L0I0I5	1.17	0.00355	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I0I5_VIBPH	Putative cytoplasmic protein USSDB7A	假定的细胞质蛋白
10	L0HW48	1.16	0.01431	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0HW48_VIBPH	L-proline glycine betaine binding ABC transporter protein ProX	甜菜碱运输系统, 底物结合: 参与细菌渗透调节, 这个区域融合于转录合成的透性酶的构件中
11	L0I145	1.16	0.02640	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I145_VIBPH	Putative secretion protein	假定分泌蛋白, 跨膜运输
12	L0I2V9	1.15	0.00397	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I2V9_VIBPH	Electron transfer flavoprotein beta subunit	Rossmann 折叠的 $\alpha/\beta$ 结构, 电子转运黄素蛋白
13	L0I4A9	1.14	0.00109	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0I4A9_VIBPH	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component alpha subunit	酮酸脱氢酶复合体 E1 组分
14	E1CXW0	1.10	0.00378	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Peru-466	E1CXW0_VIBPH	Proline rAcemase a (Tcpraca) (Tcpra45-a)(Rtcpa45)	脯氨酸消旋酶
15	L0HZ06	1.03	0.01972	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> BB22OP	L0HZ06_VIBPH	Bacterioferritin	铁蛋白: 绑定 2 价铁离子, 细胞体内铁离子平衡

注: v 是处于 VBNC 状态的副溶血弧菌, e 是处于对数期的副溶血弧菌。

上调差异蛋白鉴定结果显示, 差异蛋白大部分属于酶和外膜蛋白, 另外还有 ATP 结合蛋白和细胞质蛋白等。外膜蛋白和参与渗透调节的蛋白显著上调, 与谷氨酸合成酶、羧基转移酶、酮酸脱氢酶、脯氨酸消旋酶和铁蛋白的相关蛋白表达上调。表中显示 L0I2E0、L0I6P2 蛋白的表达量上调最为显著, 差异倍数分别为 1.98 和 1.63, L0I452 的表达量上调也较为明显, 差异倍数为 1.39, 这三个蛋白的同源蛋白功能描述都是依赖 TonB 的外膜转运体 (TonB dependent transporters, TBDTs)。W2BTX4、L0HW48 的上调量分别为 1.52 和 1.16, 这二个蛋白是和渗透调节相关。差异蛋白中与谷氨酸合成酶、羧基转移酶相关的蛋白的上调也比较显著, 达到 1.34 和 1.30。这些蛋白和副溶血弧菌的物质转运及相关代谢有关。

### 3 讨论

细菌进入 VBNC 状态是应对外界胁迫的一种应激反应, 对 VBNC 状态细菌的生理生化的变化的研究已有不少报道。Chiu SW<sup>[8]</sup>等在研究副溶血弧菌时发现, 细胞骨架蛋白 MreB 与 VBNC 菌形态变化密切相关。正常状态下, MreB 成丝状螺旋, VBNC 时则解

旋, 断裂成短丝状、弯杆状和斑点状, 而附于细胞质上, 并且 MreB 表达量增加。Um<sup>[9]</sup>研究发现茄青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 进入 VBNC 状态后含有更高水平的 DNA, 电子显微镜观察细菌细胞大小不变, 但是细胞被大量的未知细胞外物质聚合包围。蛋白组和逆转录 PCR 分析结果表明 Dps (DNA-binding proteins from starved cells) 蛋白在转录水平上上调, 细胞聚集和高浓度的 Dps 蛋白质是典型的氧化应激反应。Lai<sup>[10]</sup>等研究发现副溶血弧菌进入 VBNC 状态时有 13 种参与转录、翻译、肝糖代谢以及抗氧化的蛋白上调。

本研究发现在表达上调的蛋白中, 有 3 个蛋白都和依赖 TonB 的外膜转运体 (TBDTs) 有关, 这在目前对 VBNC 细菌的蛋白研究中少有报道。细菌对环境低浓度铁的吸收须通过一套主动运输体系才能完成, TBDTs 可以高效结合底物且不需要任何能量, 通过与 TonB 作用, 使底物穿过外膜。穿过外膜后, 含铁的底物结合蛋白, 通过细胞质膜上的通透酶 (通常是 ABC 转运体) 进入细胞质<sup>[11]</sup>。在寡营养条件下, 副溶血弧菌必须摄取微量元素铁, 因此这些蛋白的含量显著上调。丙酮酸脱氢酶 E1 调节丙酮酸的代谢, 丙酮酸是糖酵解的终

产物,也是一些重要通路的关键代谢物,当环境条件改变时,丙酮酸可以用于生成能量,营养成分可以直接从代谢途径运输到细胞循环机制<sup>[12]</sup>。本研究中酮酸脱氢酶复合体E1组分表达上调,细菌应该是通过调节酮酸脱氢酶E1的活性提高丙酮酸的代谢,使VBNC的细胞保持一个较高水平的代谢活性。另外,谷氨酸合成酶参与谷氨酸的合成,与这种酶相关的蛋白表达量亦上升。Jia<sup>[13]</sup>在研究诱导哈氏弧菌进入VBNC后的差异蛋白发现,与核苷酸和氨基酸代谢相关的蛋白表达大量上升,本研究中的谷氨酸合成酶、羧基转移酶、脯氨酸消旋酶这些参与氨基酸代谢的蛋白也都上调。可见,VBNC状态的细菌在营养缺乏和低温的逆境中,通过调节自身的蛋白表达,控制物质的转运和代谢以保持活性。

#### 4 结论

本研究采用低温、寡营养和食品防腐剂诱导副溶血弧菌进入VBNC状态,并利用iTRAQ分析活的非可培养状态下的副溶血弧菌的差异表达蛋白,鉴定到135880个蛋白,找到差异蛋白51个,其中显著上调的差异表达蛋白15个,大部分是酶和外膜蛋白,这些蛋白都和副溶血弧菌的物质转运和代谢相关。该研究结果为结合转录组进一步探讨VBNC的形成机制提供理论基础。

#### 参考文献

- [1] Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090-1094
- [2] Ross P L, Huang Y L N, Marchese J N, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(12): 1154-1169
- [3] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria [J]. Microbiol, 2005, 43: 93-100
- [4] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiol. Rev., 2010, 34: 415-425
- [5] Drake S L, Depaola A, Jaykus L. An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2007, 6(4): 120-144
- [6] 窦勇,胡佩红,顾鹏程.副溶血弧菌TDH毒素及其检测方法研究进展[J].现代食品科技,2013,29(1):215-218  
DOU Yong, HU Pei-hong, GU Peng-cheng. Research progress in *Vibrio parahaemolyticus* TDH toxin and detection methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 215-218
- [7] 李青,钟青萍,王丽.EMA结合PCR技术有效鉴别副溶血弧菌死活细胞[J].华南农业大学学报,2011,32(1):108-111  
LI Qing, ZHONG Qing-ping, WANG Li. Use of ethidium monoazide-polymerase chain reaction (EMA-PCR) for differentiation of the viable and dead cells of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2011, 32(1): 108-111
- [8] Chiu S, Chen S, Wong H. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(22): 7016-7022
- [9] Um, Kong, Lee, et al. Altered gene expression and intracellular changes of the viable but nonculturable state in *Ralstonia solanacearum* by copper treatment [J]. Plant Pathology Journal, 2013, 29(4): 374-385
- [10] Lai C, Chen S, Lin I H, et al. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 135(2): 118-124
- [11] 董妍玲,潘学武.细菌内依赖TonB的外膜铁转运体的研究进展[J].生物技术通报,2012,1:23-29  
DONG Yan-ling, PAN Xue-wu. Progress of TonB-dependent transporters for iron on outer membrane in bacteria [J]. Biotechnology Bulletin, 2012, 1: 23-29
- [12] Monahan L G, Hajduk I V, Blaber S P, et al. Coordinating bacterial cell division with nutrient availability: a role for glycolysis [J]. Mbio, 2014, 5(3): e00935-14
- [13] Jia J, Li Z, Cao J, et al. Proteomic analysis of protein expression in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio harveyi* SF1 [J]. Current Microbiology, 2013, 67(4): 442-447