

鸡大肠杆菌活的非可培养状态发生 相关基因克隆与分析

李影¹, 段锐², 王伟利³, 孙晓媛¹, 钱爱东^{1*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 吉林省辽源市畜牧总站, 辽源 136200;

3. 吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 长春 130062)

摘要: 本研究旨在从分子水平探究细菌活的非可培养状态(VBNC)的发生机制。应用冰乙酸和 4 °C 联合诱导条件, 使鸡大肠杆菌进入 VBNC 状态, 并利用 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)获得 VBNC 相关基因。结果表明, 从 VBNC 大肠杆菌中筛选得到的 3 个差异片段与大肠杆菌 23S 核糖体 RNA 基因序列具有较高的核苷酸同源性, 分别为 98%、98% 和 99%, 而氨基酸的同源性也均在 97% 以上, 表明这 3 个序列是大肠杆菌 23S 核糖体 rRNA 基因的部分序列, 同时也是与大肠杆菌 VBNC 状态发生密切相关的基因。由此推知, 当正常大肠杆菌在未暴露任何压力下时, 其转录水平较低, 特别是 23S rRNA 的某一(些)基因不显示或受到强烈抑制。当进入 VBNC 状态后, 面临生存压力时, 这一(些)基因转录水平明显强于正常状态, 而核糖体作为蛋白质合成的主要结构与场所, 其某些基因也将积极参与新蛋白质的生物合成。

关键词: VBNC 状态; 大肠杆菌; mRNA 差异显示(DDRT-PCR); 作用机制

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0322-07

Cloning and Sequence Analysis of Viable but Non-culturable State Related Genes in *Escherichia coli*

LI Ying¹, DUAN Rui², WANG Wei-li³, SUN Xiao-yuan¹, QIAN Ai-dong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University,

Changchun 130118, China; 2. Liaoyuan Animal Husbandry Stationary, Liaoyuan 136200, China;

3. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the molecular mechanisms of bacteria in viable but non-culturable (VBNC) state. Three differential fragments (A1, A2 and C1) were cloned from *E. coli* in VBNC induced by acetic acid and 4 °C with mRNA differential display PCR. These fragments were all extracted from *E. coli* in VBNC by reverse northern hybridization. The nucleotide homology between three sequences and *E. coli* 23S rRNA genes was 98%, 98% and 99%, respectively; and amino acids homology were all above 97%. These results indicated that normal *E. coli* without any selective pressure, its RNA transcript was lower, and some 23S rRNA genes were inhibited. But when in VBNC, some related genes expression were higher than that of normal state. These genes maybe participate in transcription or protein synthesis of *E. coli* in VBNC.

Key words: viable but non-culturable state; *Escherichia coli*; mRNA differential display PCR; mechanisms

收稿日期: 2009-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700594); 高等院校博士点科研基金联合资助项目(200710193002); 国家质检总局科技计划项目(2009IK168)

作者简介: 李影(1977-), 女, 吉林通化人, 副教授, 博士, 主要从事动物微生物学研究, Tel: 0431-84533426, E-mail: thliying@163.com

* 通讯作者: 钱爱东, E-mail: qiandidong0115@163.com

细菌“活的非可培养状态”(Viable but non-culturable, VBNC)自 1982 年被正式提出至今,有关这一状态的认定一直存在争议^[1-2]。究其原因,主要在于没有统一的、令人信服的“活细胞”判定标准。但是随着分子生物学技术的广泛应用,以 mRNA 作为活细胞判定标准,得到普遍认同。因为 mRNA 在细胞内不稳定,易被核酸酶快速降解,属于细胞内生存期较短的分子,是活细胞的信号分子。因此,将 RT-PCR 技术应用于细菌 VBNC 状态的研究迅速增加^[3-7]。纵观这些报道,多数研究所确定的“活细胞”标志基因都是已知基因,是通过比较该基因在 2 种不同状态下所呈现的变化或发挥的作用而确立的,这些基因只能作为检测 VBNC 细菌的充分而非必要条件。也就是说,这些基因并非 VBNC 特异性基因,那么依靠这些基因所建立的检测方法的特异性和敏感性也将会大大降低。因此,寻找与细菌 VBNC 状态发生相关的基因彰显重要。目前,寻找和发现新基因的主要技术手段是 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR),但由于原核细胞 mRNA 3'端不存在 Ploy(A)结构,设计差异基因扩增引物的难度较大^[8],因而此项技术较少用于细菌等原核细胞,而在国内外未见将其用于细菌 VBNC 状态研究的相关报道。作者此次将 DDRT-PCR 技术引入大肠杆菌 VBNC 状态的研究中,不但可以充分证明大肠杆菌 VBNC 状态的存在,而且还能获得 VBNC 状态发生相关基因,为细菌 VBNC 作用机制的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验菌株 对照组为从鸡肠道中分离,用常规方法培养的正常状态大肠杆菌 O32(E1),由作者实验室保存。试验组为经冰乙酸和 4 °C 低温联合诱导,通过平板计数、LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit 荧光染色和流式细胞仪鉴定,证实为已经进入 VBNC 状态的大肠杆菌 O32 (VE1)^[9]。

1.1.2 主要试剂 RNA 提取分离试剂(RNAiso Reagent)、RNA 酶抑制剂、DNase I、dNTPs、Ex-Taq DNA 聚合酶、pMD18-T Vector、100 bp DNA Ladder Marker、Agarose Gel DNA Purification Kit 等,均购自 TaKaRa 公司(日本)。AMV 反转录酶购自 Promega 公司(美国)。DIG DNA Labeling and Detection Kit 和 DIG Easy Hyb,购自 Roche 公

司(瑞士)。亲和硅烷、剥离硅烷、Tris、过硫酸铵等均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。相关引物^[10]的合成及测序由 TaKaRa(大连)公司完成(表 1)。

表 1 RT-PCR 引物

Table 1 Sequences of primers for RT-PCR

锚定引物 Anchor primers	序列(5'→3') Sequences	随机引物 Arbitrary primers	序列(5'→3') Sequences
M1	TTTTATCCAGC	S1	GCTGGAAAAA
M2	ACTTTACGCAG	S2	GCTGCTGGCG
M3	TTTATCCAGCG	S3	GAAGTGCTGG
M4	TCAGCGTTTTA	S4	TGGCGCGGC
M5	TTTCAGCGCCT	S5	AACTGGCGAA
M6	TTTTTTCAGCA	S6	ATGCGCTGGC
M7	TCTTTTTTACC	S7	TGCCGATGAA
M8	ATCATCCAGCA	S8	CTGGAAGAAG
M9	TTTTACCCAGC	S9	ATGGCGCTGG
M10	TTCAGCCAGCG	S10	ATGGCGATGA

1.2 方 法

1.2.1 mRNA 差异显示分离差异片段 取 E1 和 VE1 菌液各 20 mL,4 °C,6 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清,使用 RNAiso Reagent 提取细菌总 RNA。为消除细胞总 RNA 中污染的痕量 DNA,按文献^[11]方法对 RNA 进行纯化。取总 RNA 5 μL 于 70 °C 温育 5 min,立刻冰浴。然后加入下列成分:RNA 酶抑制剂(40 U·μL⁻¹) 0.5 μL,AMV Buffer 2 μL,dNTPs(25 mmol·L⁻¹) 2 μL,锚定引物(10 pmol·μL⁻¹) 0.8 μL,补水至 20 μL。轻弹使其混合,瞬间离心,42 °C 感作 1 h。将锚定引物与随机引物随机组合,对上述反转录产物进行 PCR 扩增。50 μL PCR 体系中加入下列各成分:cDNA 模板 2 μL,dNTPs(25 mmol·L⁻¹) 2 μL,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹) 1.5 μL,Ex-Taq Buffer 2.5 μL,锚定引物(10 pmol·μL⁻¹) 1.5 μL,随机引物(10 pmol·μL⁻¹) 2.5 μL,Ex-Taq 酶(10 U·μL⁻¹) 0.5 μL,补水至 50 μL。反应程序:96 °C 预变性 8 min;96 °C 40 s,38 °C 50 s,72 °C 40 s,30 个循环;72 °C 10 min,15 °C 10 min。PCR 产物先用 2% 琼脂糖凝胶初步电泳检测,若产物较多则需用 4% 中性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,便于挑选差异条带。

1.2.2 差异条带二次 PCR 扩增 二次 PCR 模板的来源可以有多种,如一次 PCR 产物的 10 倍系列稀释物、目的片段的琼脂糖凝胶回收纯化产物以及含有差异片段的琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶

等。其中前 2 种均需清洁或纯化,后 1 种可直接使用。二次 PCR 时,所用引物应与一次 PCR 相同。反应参数也可调整,特别是要提高退火温度,以确保反应特异性。50 μL PCR 体系中加入下列各成分:一次 PCR 模板 2 μL , dNTPs (25 mmol \cdot L⁻¹) 1 μL , MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹) 1.5 μL , Ex-Taq Buffer 2.5 μL , 锚定引物 (10 pmol \cdot μL^{-1}) 1 μL , 随机引物 (10 pmol \cdot μL^{-1}) 1 μL , Ex-Taq 酶 (10 U \cdot μL^{-1}) 0.5 μL , 补水至 50 μL 。反应程序:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 8 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,15 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,剩余产物在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,以备克隆与杂交用。

1.2.3 差异片段克隆与重组质粒 PCR 鉴定 二次 PCR 产物纯化后,与 pMD18-T 载体连接,而后转入大肠杆菌感受态细胞中,取培养物涂布含 Amp、x-gal、IPTG 的琼脂平板。无菌条件下,用牙签挑取平板上生长的白色菌落,接种含 Amp (终浓度为 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的液体 LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$,振荡培养过夜,小量提取质粒进行 PCR 鉴定。在 50 μL PCR 反应体系中加入下列各成分:重组质粒模板 1 μL , dNTPs (25 mmol \cdot L⁻¹) 1 μL , MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹) 1.5 μL , Ex-Taq Buffer 2.5 μL , 锚定引物 (10 pmol \cdot μL^{-1}) 1 μL , 随机引物 (10 pmol \cdot μL^{-1}) 1 μL , Ex-Taq 酶 (10 U \cdot μL^{-1}) 0.4 μL , 补水至 50 μL 。反应程序:96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 8 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,28 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,15 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。同时设立空载体对照,产物在 1% 琼脂糖凝胶上检测。

1.2.4 差异片段反向 Northern 杂交验证 用酚/氯仿对 E1 和 VE1 反转录产物 (cDNA) 抽提纯化后,按 Roche 公司的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明书,将其标记为探针。然后取 1 μL 样品 (重组质粒或重组质粒 PCR 扩增产物) 均匀点在带正电荷的尼龙膜上,80 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30~45 min,再加入预热的 DIG Easy Hyb,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 30 min。同时取适当体积的已标记探针在 PCR 仪上 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,迅速置冰上冷却,而后将膜移至含有探针的杂交液中,45 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 16 h。洗膜和免疫检测后,待显色完毕,用 TE (pH8.0) 终止反应。

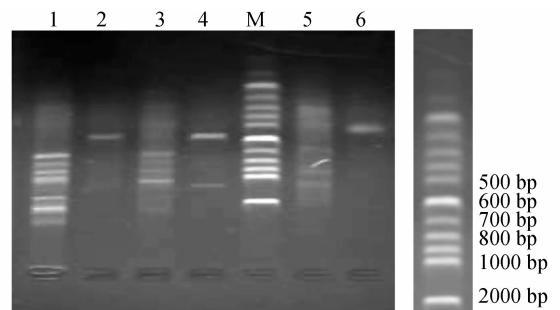
1.2.5 差异片段序列分析 将验证的差异片段测序后,登录 NCBI 网站进行在线分析。首先利用网站提供的 nucleotide blast 功能在 nr 库中对差异片段进行核苷酸序列比较,然后再利用 tblastx 功能

在 Bacterial 11 库中进行氨基酸序列比较。

2 结果

2.1 RT-PCR 琼脂糖凝胶检测结果

在 100 个引物组合中,只有 M2 与 S6、M3 与 S6 和 M10 与 S4 组合能同时将 2 种状态大肠杆菌的 cDNA 片段扩出 (图 1)。其中引物 M3 与 S6 从 VE1 中扩增出了约 600 (A) 和 1 100 bp (B) 2 个片段,引物 M2 与 S6 扩增出 1 条约 600 bp (C) 的片段,而 M10 与 S4 则扩增出 1 条 500 bp (D) 左右的片段。这些片段均在 E1 电泳图谱中不可见 (不排除因琼脂糖凝胶分辨率低,出现此片段的可能性),而在 VE1 电泳图谱中则为其特有片段,故将这些片段暂定为“差异片段”。为减少反应假阳性对试验结果的干扰,保证所获得的差异显示图谱和片段的稳定性,降低后续验证工作的难度,再次应用上述 3 对引物进行重复扩增。结果证实,重复扩增图像与图 1 完全一致,重复性较高,并且 VE1 所呈现的差异条带也比较稳定。



1、2. 引物 M2/S6 组合;3、4. 引物 M3/S6 组合;5、6. 引物 M10/S4 组合;M. 100 bp 相对分子质量标准;1、3、5. E1; 2、4、6. VE1

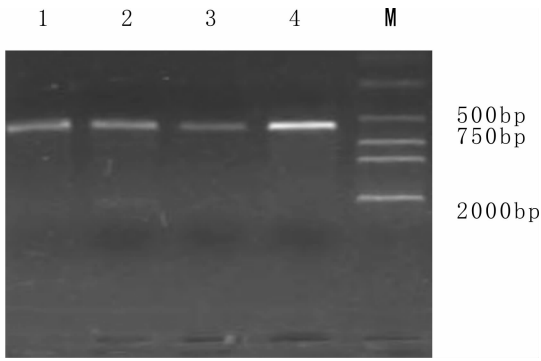
1、2. Primers M2/S6; 3、4. Primers M3/S6; 5、6. Primers M10/S4; M. 100 bp ladder;1、3、5. E1; 2、4、6. VE1

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 The amplification results of RT-PCR

2.2 差异片段二次 PCR 扩增结果

经一次 PCR 扩增,引物 M2 与 S6、M3 与 S6 和 M10 与 S4 组合可扩增得到 4 条差异条带 (A、B、C、D),并且可重复出现。但这 4 条差异片段,经二次 PCR 扩增后,只有 A、C 2 条片段 (大于 500 bp) 可重复出现,并且没有出现杂带,予以保留。而 B、D 2 条片段的二次 PCR 扩增产物中均存在杂带,且片段长度也与其不一致,予以剔除。



1,2. 片段 A 二次 PCR 产物; 3,4. 片段 C 二次 PCR 产物; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1,2. Second PCR products of different fragment A; 3, 4. Second PCR products of fragment C; M. DL2000 DNA marker

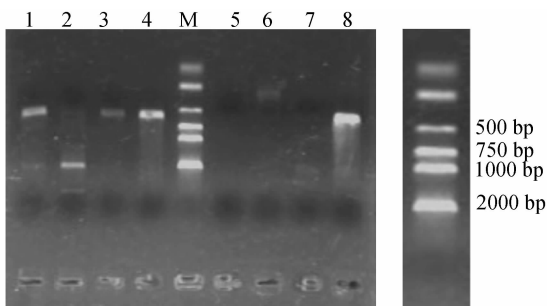
图 2 差异片段 A 和 C 二次 PCR 扩增结果

Fig. 2 Second PCR amplification results of different fragment A and C

2.3 差异片段重组质粒 PCR 鉴定结果

将纯化后的差异显示片段(A、C)连接到载体上,经过 PCR 鉴定可知,图 3 中空载体对照组没有出现 DNA 条带,而 1、3、4、8 泳道中的重组质粒均出现产物,且其大小与插入片段大小相同,说明差异片段 A 已与载体 DNA 重组。第 2 泳道约 2 000 bp 的扩增产物与插入片段大小不符,故将其剔除。

图 4 中,空载体对照组没有出现 DNA 条带,1、3、5、6、7 泳道中的重组质粒均出现产物,且其大小与插入片段大小相同,同样说明差异片段已与载体 DNA 发生重组。但第 2 泳道产物出现弥散现象,故将其剔除。

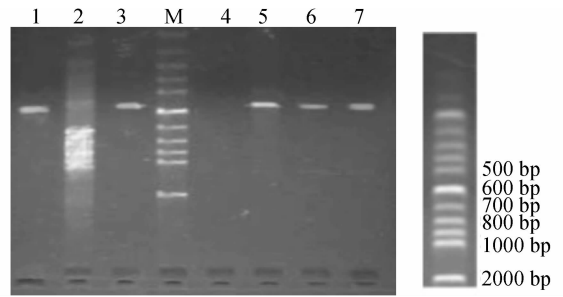


1~4,6~8. 重组质粒; 5. T 载体对照组; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准

1-4,6-8. PCR products from 8 differential transformed *E. coli*; 5. T-Vector control group; M. DL2000 DNA marker

图 3 片段 A 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 3 The results of differential fragment A recombinant plasmids by PCR detection



1~3,5~7. 重组质粒; 4. T 载体对照组; M. 100 bp 相对分子质量标准

1-3,5-7. PCR products from 6 differential transformed *E. coli*; 4. T-Vector control group; M. 100 bp ladder

图 4 片段 C 重组质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 4 The results of differential fragment C recombinant plasmids by PCR detection

2.4 差异片段反向 Northern 杂交验证结果

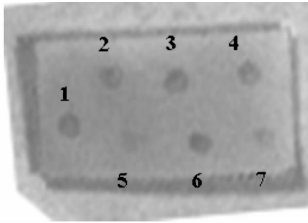
将含有差异片段的阳性重组质粒、二次 PCR 回收纯化产物点样于尼龙膜,然后分别与 E1 和 VE1 的 cDNA 探针进行杂交。其中,片段 A 和 C 的二次 PCR 回收纯化产物、6 个含有 A 片段的阳性重组质粒以及 7 个含有 C 片段的阳性重组质粒均与 VE1 的 cDNA 探针杂交有信号,为阳性(图 5、6)。而与 E1 的 cDNA 探针杂交则无信号,为阴性(结果未列出),说明这 2 个片段是大肠杆菌进入 VBNC 状态所表达的主要差异基因。

2.5 差异片段序列分析结果

对经验证的 6 个含有 A 片段的阳性重组质粒和 7 个含有 C 片段的阳性重组质粒进行了序列测定,共得到 13 条序列。序列分析结果表明,在含有 A 片段的 6 条序列中,有 3 条完全相同,有 2 条不含引物(应将其剔除),最后得到 2 条序列(A1、A2),这 2 条序列的核苷酸同源性较高,为 99.2%。而在含有 C 片段的 7 条序列中,有 4 条完全相同,有 3 条不含引物序列,最后只得到 1 条序列 C1。故本试验共得到 3 条差异片段(A1、A2 和 C1),分别为 611、610 和 600 bp。

将这 3 个序列在线输入 Nucleotide blast 和 tblastx 搜索对话框内,要求精确匹配(e 值为 0)。表 2 显示,3 个序列均与大肠杆菌 23S 核糖体 RNA 基因具有较高的核苷酸同源性,其中 C1 最高,可达 99%,A1 和 A2 次之,但两者也均在 98%以上,氨基酸的同源性也均在 97%以上。此外,3 个序列还与志贺氏菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、产气肠杆菌、鼠疫耶尔森菌、弗罗因德(氏)枸橼酸杆菌等细菌的

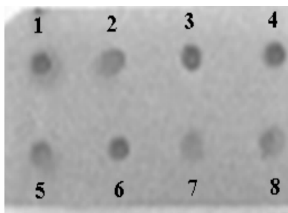
23S 核糖体 RNA 有较高的同源性,而同源性的高低与种属亲缘关系远近密切相关。综合以上结果,作者所获差异序列实为编码大肠杆菌 23S 核糖体 RNA 的部分 rDNA 基因,这是一种中等重复并有转录活性的保守基因,广泛存在于大肠杆菌及其相近的种属中。



1. 片段 A 的 PCR 纯化产物; 2~7. 片段 A 的阳性重组质粒
1. Second PCR purification products; 2-7. Recombinant plasmids of differential fragment A

图 5 片段 A 反向杂交检测结果

Fig. 5 The hybridization results of differential fragment A and VE1 cDNA probes by reverse northern blot



1. 片段 C 的 PCR 纯化产物; 2~8. 片段 C 的阳性重组质粒
1. Second PCR purification products; 2-8. Recombinated plasmids of differential fragment C

图 6 片段 C 反向杂交检测结果

Fig. 6 The hybridization results of differential fragment C and VE1 cDNA probes by reverse northern blot

3 讨论

众所周知,核糖体是生物体蛋白质合成和装配的场所,由 rRNA 和核糖体蛋白组成,编码 rRNA 的基因称为 rDNA^[12]。在原核生物中,23S 核糖体 RNA 基因(rDNA),由 2 904 个核苷酸组成,含量相对稳定,约占 DNA 总量的 0.1%~0.5%^[13]。rDNA 在基因组中有多个拷贝,拷贝数从 1 到 14 不等,其数目与基因组的 rRNA 操纵子(rrn)数目一致^[14],因此认为这个基因是一种中等重复并有转录活性的基因。显然,作者所获得的 3 个同源性较高的 VBNC 发生相关基因不但有可能参与自身核糖体大亚基的构成,还有可能参与转录。尽管目前国内关于细菌 VBNC 状态发生机制的报道较少,但 Sabina^[15]、Abee^[16]和 Heiskanen^[17]等人在研究细菌

VBNC 状态发生机制时,均认为 VBNC 状态可能是由一个或一组基因控制的,这些基因在生长快速且未暴露任何压力下,表达水平较低,但是在自然环境或不良人为环境中时却能被大量表达。在利用 DDRT-PCR 获取 VBNC 差显片段时,作者发现从 VBNC 菌中所扩增出的产物较少。一般地,一对随机引物仅能扩出 1 或 2 条片段,即便是用 PEGE 凝胶分离,也未获成功。而且,此种情况在研究沙门氏菌和志贺氏菌时也遇到过,似乎这些随机引物已成了 VBNC 细菌的“特异性”引物。但从引物对正常状态细菌 cDNA 的扩增结果看,不但产物多而且随机分布,故不能质疑引物的随机性,这反而证实了细菌在 VBNC 状态下所启动的相关基因少的结论。另外,研究所选用的随机引物是根据大肠杆菌基因组中高频出现的重复序列设计而来,对大肠杆菌的研究针对性很强,因而对表达较少基因的 VBNC 细菌 cDNA 的“特异性”扩增是可能的。因此,作者对于大肠杆菌 VBNC 状态发生机制作如下理解:当正常大肠杆菌在未暴露任何压力下时,其转录水平较低,特别是 23S rRNA 的某一(些)基因不显示或受到强烈抑制。当进入 VBNC 状态后,面临生存压力时,这一(些)基因转录水平明显强于正常状态,而核糖体作为蛋白质合成的主要结构与场所,这一(些)基因也将积极参与新蛋白质的生物合成。

此外,本研究发现大肠杆菌 VBNC 发生相关基因广泛存在于大肠杆菌及其相近菌属中,属于种群基因,因而一旦证明该组基因为 VBNC 状态发生的特异性“种群基因”,就可以建立针对该基因的检测方法,必将具有显著的实际意义。例如,目前畜产品中的食源性病原菌(大肠杆菌 O157、沙门氏菌、志贺氏菌、李氏杆菌等)常会造成群发性伤害,引起严重的公共卫生危机。但是对于一些进入了 VBNC 状态的病原菌而言,依靠传统的培养技术、敏感的 PCR 技术乃至高通量的基因芯片技术也很难将其检测出来,并且极易被认定是“死”菌^[18-20]。因为病原菌在不良环境中进入 VBNC 状态后,不但丧失了培养基中生长繁殖的能力,而且还能够启动与原菌不同的基因,但仍旧具有与原菌相似的致病性,可以逃避检测,成为隐性传染源。显然建立针对畜产品相关病原菌 VBNC 状态基因的检测方法,对于保障动物源性食品质量与安全将起到积极作用。因而,继续加强“VBNC 种属特异性基因”的筛选与鉴定方面的研究,将是进一步研究的重要内容之一。

表 2 差异片段在线 Blast 比对结果

Table 2 Partial results of fragment A1, A2 and C1 blast to nr and bacteria 11 database GenBank

收录号 Accession number	描述 Description	A1				A2				C1				基因功能 Gene function
		nucleotide blast		tblastx		nucleotide blast		tblastx		nucleotide blast		tblastx		
		E value	Max ident	E value	Max ident	E value	Max ident	E value	Max ident	E value	Max ident	E value	Max ident	
AP009048.1	<i>Escherichia coli</i> W3110, DNA	0.0	99%	9e-115	98%	0.0	98%	5e-115	98%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
U00096.2	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655, DNA	0.0	99%	9e-115	98%	0.0	98%	5e-115	98%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
AE014075.1	<i>Escherichia coli</i> CFT073, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
CP000468.1	<i>Escherichia coli</i> APEC O1, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
V00331.1	<i>E. coli</i> gene rrnB, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
AF053966.1	<i>Escherichia coli</i> rrlD operon, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
U18997.1	<i>Escherichia coli</i> K-12, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
J01695.1	<i>E. coli</i> rRNA operon (rrnB) coding, DNA	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	98%	4e-114	97%	0.0	99%	3e-102	99%	23S rRNA encoding gene
CP000038.1	<i>Shigella sonnei</i> Ss046, DNA	0.0	98%	6e-114	97%	0.0	98%	1e-113	96%	0.0	98%	1e-118	97%	23S rRNA encoding gene
DQ682621.1	<i>Shigella dysenteriae</i> strain EK3, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	95%	23S rRNA encoding gene
DQ682623.1	<i>Shigella sonnei</i> strain 14 23S ribosomal RNA gene, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	94%	23S rRNA encoding gene
DQ682620.1	<i>Shigella boydii</i> strain EK2 23S ribosomal RNA gene, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	95%	23S rRNA encoding gene
AE005674.1	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	94%	23S rRNA encoding gene
AE014073.1	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	94%	23S rRNA encoding gene
CP000036.1	<i>Shigella boydii</i> Sb227, DNA	0.0	98%	5e-113	97%	0.0	98%	6e-111	96%	0.0	98%	2e-116	94%	23S rRNA encoding gene
U77921.1	<i>Salmonella enterica</i> II 1,9,12;1,w,e,n,x, DNA	0.0	96%	6e-104	95%	0.0	96%	5e-102	92%	0.0	97%	5e-109	94%	23S rRNA encoding gene
AE008893.1	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2, DNA	0.0	96%	6e-104	95%	0.0	95%	4e-105	94%	0.0	97%	1e-110	95%	23S rRNA encoding gene
U77922.1	<i>Salmonella enterica</i> IIIb 61;i;z, DNA	0.0	95%	3e-103	96%	0.0	95%	5e-102	92%	0.0	96%	2e-108	94%	23S rRNA encoding gene
U77920.1	<i>Salmonella enterica</i> 1,4,[5],12,i;1, DNA	0.0	95%	2e-104	96%	0.0	95%	6e-103	93%	0.0	96%	2e-108	93%	23S rRNA encoding gene
U77928.1	<i>Citrobacter freundii</i> 23S ribosomal RNA(rrl)gene, DNA	0.0	94%	7e-95	90%	0.0	93%	5e-96	89%	0.0	94%	5e-102	91%	23S rRNA encoding gene
AY116931.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain ATCC 15830, DNA	0.0	93%	1e-92	86%	0.0	93%	1e-96	87%	0.0	94%	5e-101	89%	23S rRNA encoding gene
X87284.1	<i>K. pneumoniae</i> 23S rRNA gene. ATCC 13883 T	0.0	93%	5e-92	85%	0.0	93%	1e-96	87%	0.0	94%	5e-101	89%	23S rRNA encoding gene
AY116918.1	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain ATCC 13048, DNA	0.0	92%	4e-93	86%	0.0	92%	1e-97	85%	0.0	93%	2e-103	86%	23S rRNA encoding gene
BX950851.1	<i>Ercinia carotovora</i> subsp. atroseptica SCRI1043, DNA	0.0	92%	1e-89	87%	0.0	91%	3e-90	82%	0.0	92%	5e-95	86%	23S rRNA encoding gene
CP000668.1	<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F, DNA	0.0	91%	9e-86	87%	0.0	91%	5e-89	80%	0.0	92%	2e-93	85%	23S rRNA encoding gene
AL590842.1	<i>Yersinia pestis</i> CO92 complete genome, DNA	0.0	91%	9e-86	87%	0.0	91%	5e-89	80%	0.0	92%	2e-93	85%	23S rRNA encoding gene
BX936398.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP32953 genome, DNA	0.0	91%	9e-86	87%	0.0	91%	5e-89	80%	0.0	92%	2e-93	85%	23S rRNA encoding gene

参考文献:

- [1] MICHAEL R B, GREGG B, STECK T R. The viable but nonculturable concept, bacteria in urine samples, and Occam's Razor[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(11):5434-5435.
- [2] LIU S V. Viable but non-culturable (VBNC) microorganisms: A misnomer or a whistle-blower? [J]. *Logical Biology*, 2000, 75(1):17-20.
- [3] COUTARD F, POMMEPUY M, LOAEC S, et al. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 75(4):951-961.
- [4] ASAKURA H, ISHIWA A, ARAKAWA E, et al. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(4):869-879.
- [5] COUTARD F, LOZACH S, POMMEPUY M, et al. Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(16):5183-5189.
- [6] LIU Y, GILCHRIST A, ZHANG J, et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in drinking water and river water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5):1502-1507.
- [7] LOTHIGIUS A, SJÖLING A, SVENNERHOLM A M, et al. Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(5):2091-2098.
- [8] 李影, 钱爱东. 利用重复序列设计原核细胞差异显示 RT-PCR 引物研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(2):337-340.
- [9] 李影, 魏忠彬, 钱爱东. 低浓度冰醋酸诱导的鸡源大肠杆菌活的非可培养状态的研究[J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(5):645-648.
- [10] FISLAGE R, BERCEANU M, HUMBOLDT Y, et al. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(9):1830-1835.
- [11] 罗文永, 李晓方, 胡骏, 等. 利用有序差异显示技术克隆受稻瘟菌病菌诱导表达的水稻 cDNA 的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(7):635-641.
- [12] 邢卉春, 李兰娟. 基于核糖体 RNA 的分子生物学技术在肠道菌群分析中的应用[J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(1):67-70.
- [13] 张今今, 王跃进. mRNA 差异显示技术克隆中国葡萄属野生种核糖体 RNA 基因[J]. *西北植物学报*, 2005, 25(11):2163-2167.
- [14] 鲁辛辛, 杨持, 杨宏欣. 16s~23s rDNA 间区在链球菌和流感嗜血杆菌分类中的应用[J]. *遗传*, 2003, 25(2):189-194.
- [15] SABINA H, MARIA M L. The Viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis [J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 12(2):6739-6745.
- [16] ABEE T, WOUNTERS J A. Microbial stress response in minimal processing[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 50(1):65-91.
- [17] HEISKANEN P, TAIRA S, RHEN M. Role of *rpoS* in the regulation of *Salmonella* plasmid virulence (spv) genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 123(2):125-130.
- [18] DU M, CHEN J X, ZHANG X H, et al. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2):1349-1354.
- [19] JOHN M P, HENDRIK S, JOEL T W, et al. Peptidoglycan O acetylation and autolysin profile of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state[J]. *Journal Bacteriology*, 2006, 188(2):902-908.
- [20] MONICA O, ESTER M N, MARIA M L, et al. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against copper: induction of the viable-but-nonculturable state [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(5):3482-3488.