

H-NS 基因作为靶基因的荧光定量 PCR 快速检测海产品中的副溶血性弧菌

朱耀磊, 桑 雪, 甘未祺, 张公亮, 侯红漫*

(大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

摘 要:目的:建立一种利用 SYBR Green I 荧光 PCR 反应快速、准确、便捷检测副溶血性弧菌的方法。方法:根据副溶血性弧菌的 H-NS 基因的保守区域设计引物,利用副溶血性弧菌的标准菌株以及 12 株其他种属的常见致病菌对引物的特异性和灵敏度进行评价。基于该基因利用 SYBR Green I 荧光 PCR 检测方法建立标准曲线,确定该检测方法的灵敏度。对用不同浓度的菌液污染的灭菌过的蜆子样品进行检测,确定该方法的可行性。最后用该方法检测 30 份蜆子样品,并与国标 GB4789.7-2013 检测结果进行比较。结果:用 H-NS 基因作为靶基因检测副溶血性弧菌的 SYBR Green I 荧光 PCR 检测方法,建立的标准曲线的相关系数为 0.998,检测灵敏度为 7.3×10 CFU/mL。人工污染蜆子的检出限为 6.7×10^2 CFU/mL。对蜆子样品的检测结果为 30 份样品中有 4 份含有副溶血性弧菌,与国家标准方法(GB 4789.7-2013)的检测结果具有一致性。结论:表明该方法可以用于副溶血性弧菌的快速检测。

关键词:副溶血性弧菌, SYBR Green I, 荧光定量 PCR, H-NS 基因

Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by Real-time PCR targeted to the H-NS gene

ZHU Yao-lei, SANG Xue, GAN Wei-qi, ZHANG Gong-liang, HOU Hong-man*

(School of Food Science and Technology, Dalian polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Objective: In this study, a rapid and accurate method was established to detect *Vibrio parahaemolyticus* of using SYBR Green I fluorescence PCR reaction. Methods: Primers were designed by using conserved region of the H-NS gene. Twelve non *Vibrio parahaemolyticus* were amplified by PCR to confirm the specificity. Based on H-NS gene, the standard curve was established and the sensitivity was determined by SYBR Green I fluorescence PCR reaction. Sterile clam samples contaminated by different concentrations of bacteria were detected to determine the feasibility of this method. Then, thirty clam samples were detected, and the results were compared with the GB 4789.7-2013. Results: Correlation coefficient of the standard curve established in this study was 0.998, and the sensitivity was 7.3×10 CFU/mL. The detection limit of artificial contamination was 6.7×10^2 CFU/mL. There were four positive results detected in the thirty samples by using SYBR Green I fluorescence PCR method which was consistent with GB 4789.7-2013. Conclusion: Method of this article could be used in rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; SYBR Green I; Real-time PCR; H-NS gene

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)19-0155-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.19.024

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌,它作为人类食源性致病菌能引起肠胃炎和败血症。副溶血性弧菌广泛分布于自然界,尤其以海产品携带率最高^[1-2]。目前,副溶血性弧菌引起食物中毒的发生规模以及人群暴露规模呈明显上升趋势,已成为我国首要的食源性致病菌^[3]。

研究表明,副溶血性弧菌产生的毒素有溶血素和尿素酶。其致病因子主要有耐热直接溶血毒素、耐热直接相关溶血毒素、不耐热溶血毒素,分别由相关的 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 基因编码。因此这三种毒力基因是副溶血性弧菌 PCR 检测的常用基因^[4]。本实验所采用的 H-NS 基因是副溶血性弧菌的一种特异性基因,

收稿日期: 2015-01-12

作者简介: 朱耀磊(1989-),男,硕士,研究方向:食品分析与检测, E-mail: yaoleizhu@126.com。

* 通讯作者: 侯红漫(1964-),女,博士,教授,研究方向:食品微生物, E-mail: houghongman@dlpu.edu.cn。

基金项目: 辽宁省高校重大科技平台(辽教发[2011]191号);辽宁省特聘教授(辽教发[2012]145号)。

存在于所有的现存的副溶血性弧菌中,它参与控制合成副溶血性弧菌拟核 DNA 上的一种结合蛋白,参与调控菌株对外界环境变化的适应性反应应答,具有副溶血性弧菌菌种特异性和设计特异性引物的保守区域^[5]。

SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染料,与双链 DNA 结合后,其荧光大大增强,且其荧光强度的增加与双链 DNA 的数量呈正比,而不掺入链中的 SYBR Green I 染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步,因此可以根据荧光信号检测出反应体系中存在的双链 DNA 数量^[1]。实时荧光定量 PCR 的出现,更是将 PCR 检测技术提高到定量的水平,并且检测灵敏度得到进一步提高。对于以 H-NS 基因做为靶基因检测副溶血性弧菌的研究中,A-R.No^[6]利用三重 PCR 技术对水产品中的副溶血性弧菌进行了检测。该实验以 H-NS 基因为靶基因用荧光定量 PCR 技术检测水产品中的副溶血性弧菌尚未有过报道。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

阳性菌株:副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*);阴性对照菌株:溶藻性弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、产气杆菌(*Enterococcus faecalis*)、溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*),所有菌株均来自中国普通微生物保藏管理中心;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、蛋白酶 K、RNA 酶 天根生化科技有限公司;SYBR Premix Ex Taq 荧光染料、Ex Taq DNA 聚合酶 大连宝生物有限公司。

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、荧光定量 PCR 仪(IQ3) 美国 BIO-RAD 公司;超速冷冻离心机、超速离心机 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 模板的制备 将斜面保存的副溶血性弧菌的标准菌株,接种到液体牛肉膏蛋白胨完全培养基中,在 37 ℃、160 r/min 条件下于摇床中培养 18 h。取出后按照 GB 4789.7-2013 进行平板菌落计数,记录液体菌落的数目。然后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作对该菌进行 DNA 的提取,提取的 DNA 于 4 ℃ 保存。

1.2.2 引物的设计与合成 从 NCBI 上获取副溶血性弧菌和其它菌的 H-NS 基因序列,采用 ClustalX 软件分析副溶血性弧菌和其他菌的同源性,确定出其在副溶血弧菌菌株内保守而在其它菌株间特异的序列。运用 Primer 5.0 引物设计软件在副溶血性弧菌菌株间的保守区域进行引物设计。引物由上海生工生物公司合成。设计出来的引物序列为:

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

目标基因	引物序列(5'-3')	PCR 产物 (bp)
H-NS	上游 ACTGTTGTTGAAGAGCGTCGTG	190
	下游 ACTTAGCTGGGCGAGGAGC	

1.2.3 引物特异性分析 按照方法 1.2.1,分别制取其他 15 种常见致病菌的 DNA 模板,按照下列体系进行 PCR 扩增:上下游引物 1 μL,模板 DNA 1 μL,Ex Taq DNA 聚合酶 10 μL,灭菌超纯水 7 μL,混匀,简短离心。PCR 体系:94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,72 ℃ 续延伸 5 min,32 个循环。取出 PCR 产物,用 1% 的琼脂糖凝胶,进行电泳检测。

1.2.4 荧光定量 PCR 反应体系及反应条件 荧光定量 PCR 检测的反应体系为 25 μL 体系,其中 SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL,模板 2 μL,上下游引物 0.5 μL,灭菌超纯水 9.5 μL,反应条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,62 ℃ 退火 25 s,72 ℃ 延伸 15 s,80 ℃ 下检测荧光 15 s,40 个循环。

1.2.5 标准曲线的建立 将方法 1.2.1 中制成的 DNA 模板进行 10 倍梯度稀释,稀释成 10^{-1} ~ 10^{-8} ,以浓度梯度的标准品为模板,按方法 1.2.4 中反应条件,用荧光定量 PCR 仪同时扩增,反应结束后以 Ct 值为 y 轴,以起始模板稀释度的对数为 x 轴绘制标准曲线^[7]。

1.2.6 人工污染样品,确定检出限 重新获得培养过夜的菌液,进行平板菌落计数。取 1 mL 菌液,用 0.8% 生理盐水对其进行 10 倍系列稀释。同时,分别取 10^{-1} ~ 10^{-7} 7 个稀释度的菌液对购买于当地超市的即食蚬子样品进行人工污染,之前按国标法检测证实该样品不含副溶血性弧菌。取 1 mL 人工污染的蚬子样品匀浆液用试剂盒法提取其基因组 DNA,作为模板,按照 1.2.4 条件进行荧光定量 PCR 扩增^[8]。

1.2.7 水产样品中副溶血性弧菌检测 从大连各大市场和超市购买了 30 份新鲜的蚬子样品。每份样品 200 g,每份样品取 10 g,进行如下处理:将其加入到含有 15 mL 0.01 mol/L 的 PBS 溶液(pH7.4)的 30 mL 离心管中,超声波处理 1 min,然后置于恒温摇床中 300 r/min 振荡 5 min,将上层液体小心转移到另一离心管中,加入 15 mL PBS,重复上述步骤。取 1 mL 提取 DNA,作为检测模板。并对该 30 份样品进行国标方法(GB 4789.7-2013)检测,进行结果对比。

2 结果与分析

2.1 引物特异性的检测结果

引物的特异性验证结果见图 1。由图 1 所示,只有以副溶血性弧菌 DNA 为模板的泳道出现明亮的条带,而在其余泳道没有出现条带,表明该引物的特异性较强。

2.2 标准曲线的建立

以相对荧光强度为 y 轴,循环数为 x 轴绘制扩增曲线(图 1),以获得标准曲线(图 2)。通过 Ct 值检

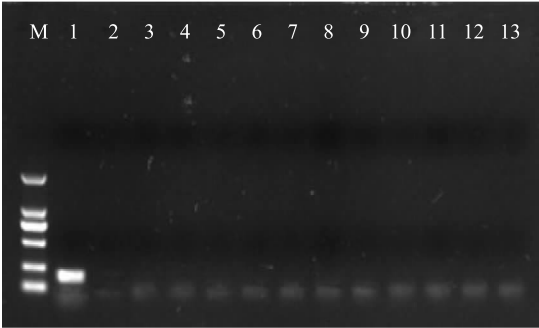


图1 副溶血性弧菌引物特异性验证

Fig.1 Specific detection of *Vibrio parahaemolyticus*

注:M: DL2000 ladder marker, 1: 副溶血性弧菌, (*Vibrio parahaemolyticus*), 2: 溶藻性弧菌 (*Vibrio alginolyticus*), 3: 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*), 4: 霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*), 5: 创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*), 6: 单核细胞增生李氏特氏菌 (*Listeria monocytogenes*), 7: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 8: 产气杆菌 (*Enterococcus faecalis*), 9: 溶血性链球菌 (*Streptococcus hemolyticus*), 10: 空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*), 11: 阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*), 12: 福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*), 13: 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)。

测软件自动生成以 Ct 值为 y 轴,以起始菌液 DNA 浓度的常用对数为 x 轴绘制的标准曲线,所测得的标准曲线的方程式为 $Y = -3.356X + 41.40$, 相关系数 R^2 为 0.998。将待测样品扩增得到的 Ct (Y 值) 代入公式,即可得到待测样品中模板的浓度。由图 2、3 可知,利用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌可以得到较好的扩增曲线和标准曲线,标准曲线显示线性关系良好,可以在宽广的范围内进行准确定量;扩增效率 $E = 98.6\%$, 处于 $80.0\% \sim 120.0\%$ 之间,扩增效率较高。阴性对照反应未检测出荧光信号,表明反应体系无污染。

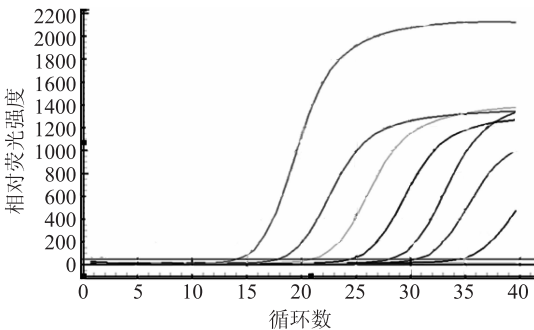


图2 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 稀释度的
初始菌液 DNA 荧光 PCR 检测的扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of $10^{-1} \sim 10^{-7}$ dilutions of
initial bacteria DNA detected by fluorescent PCR

图:图中线从左至右稀释度依次为 $10^{-1} \sim 10^{-7}$, 图 4 同。

2.3 荧光定量 PCR 方法灵敏度确定

按照国标菌落计数,初始菌落的总数为 7.3×10^8 CFU/mL,取提取的初始菌液 DNA 溶液 $10 \mu\text{L}$,进行 10 倍梯度稀释,则 8 个不同稀释度 ($10^{-1} \sim 10^{-8}$) 的 DNA 溶液分别代表的菌液浓度为: 7.3×10^7 、 $7.3 \times$

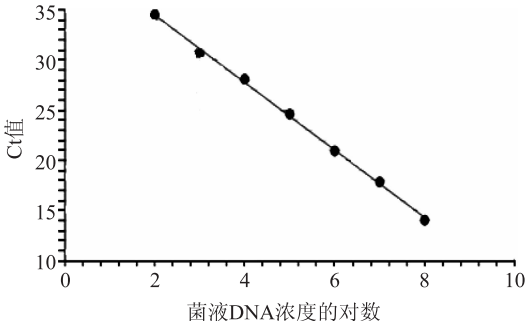


图3 SYBR Green I 荧光 PCR 方法建立的标准曲线

Fig.3 Standard curve established by
SYBR Green I fluorescence PCR method

10^6 、 7.3×10^5 、 7.3×10^4 、 7.3×10^3 、 7.3×10^2 、 7.3×10 、 7.3 CFU/mL。由扩增曲线图可以看出,在稀释度为 10^7 时,具有良好的扩增曲线,而且在标准曲线中也有较好的 Ct 值。而在 10^8 的稀释度上,扩增曲线与阴性对照相重合,没有明显的扩增。可以确定利用 SYBR Green I 荧光 PCR 方法检测副溶血性弧菌的灵敏度为 7.3×10 CFU/mL。

2.4 人工污染的检出限

由表 2 可知,检测样品均获得较好的 Ct 值。图 4 显示,人工污染检出限为稀释度为 10^6 时 DNA 的浓度,换算成菌落总数为 6.7×10^2 CFU/mL (起始菌悬液活菌计数结果为 6.7×10^8 CFU/mL),得到检出限为 6.7×10^2 CFU/mL。

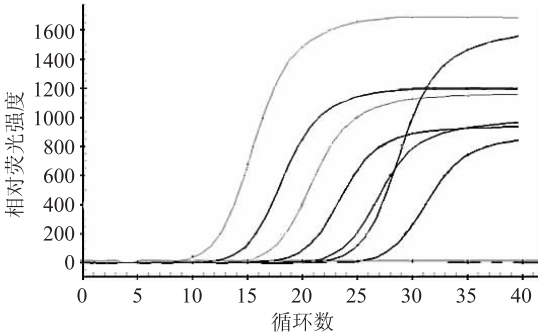


图4 不同浓度菌液人工污染样品的 DNA 扩增曲线

Fig.4 Amplification curve of different concentrations
of bacteria DNA of artificially contaminated samples

表2 人工污染检出限

Table 2 Artificial contamination detection limit

稀释度	Ct 值	副溶血性弧菌细胞数 (CFU/mL)
10^0	11.4	6.7×10^8
10^1	15.8	6.7×10^7
10^2	19.4	6.7×10^6
10^3	22.1	6.7×10^5
10^4	25.8	6.7×10^4
10^5	26.9	6.7×10^3
10^6	30.4	6.7×10^2

2.5 样品检测

用建立的 SYBR Green I 荧光 PCR 方法对采集到的 30 份样品进行检测,检测结果见图 5,包含有 4 条

扩增曲线,表明检测出4份样品携带有副溶血性弧菌。按照国标(GB 4789.7-2013)方法,进行检测的结果也为4份,两者检测结果一致。

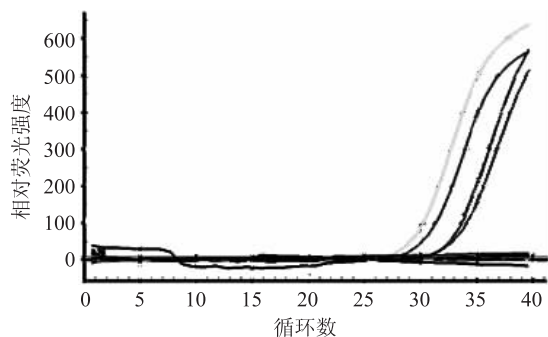


图5 30份蛏子样品的SYBR Green I 荧光PCR检测的结果

Fig.5 Results of 30 parts of clam samples detected
by SYBR Green I PCR assay

2.6 讨论

用分子生物学方法对致病菌的检测,主要就是靶基因的选择。其关键是选择特异的保守基因作为靶基因,设计特异性的引物,选择合适的PCR条件。徐晓可等^[5]选用 *toxR* 和 *tlh* 基因设计特异性引物,利用二重PCR检测方法对水产品中的副溶血性弧菌进行检测,灵敏浓度为 10^3 CFU/mL。本实验选择副溶血性弧菌的 H-NS 基因作为检测的目的基因,其具有较强的特异性和保守性。以往对副溶血性弧菌的检测中用到的多为 *toxR*^[2]、*gyrB*^[9]、*tlh*^[10]、*irgB*^[11] 基因,而对于 H-NS 基因在副溶血性弧菌的检测中的应用鲜有报道。A-R.No^[6]等人运用 H-NS 基因结合 *tdh*、*trh* 基因,用三重PCR方法对副溶血性弧菌进行了检测,然而其灵敏度只能达到 10^5 CFU/mL。近年来逐渐发展成熟的荧光定量PCR,具有较高的灵敏度,在微生物检测中得到了广泛的应用^[12]。在出入境检验检疫行业标准中,对植物及其产品转基因成分检测^[13]和出口贝类中大肠菌群、粪大肠菌群的检测^[14]中,均用到了荧光定量PCR的方法。荧光定量PCR有探针型和染料型,相比于探针型,染料型具有更高的灵敏度^[2],并且不需要设计合成昂贵的探针,操作更为简便。王昊宇等^[10]应用SYBR Green I溶解曲线检测食源性单增李斯特菌,检出限为 8.6×10 CFU/mL。然而对于探针型,由于探针的使用,使得其特异性要高于染料型,这也是染料型荧光定量PCR的不足。Blackstone等^[15]建立了1种利用TaqMan探针的快速定量优点,建立了检测含 *tdh* 基因的副溶血弧菌的实时PCR方法,检出限为 10^2 数量级的纯培养菌液。蔡潭溪等^[16]利用 *gyrB* 基因序列设计合成了1对引物和1个TaqMan探针,建立了一种定量检测副溶血弧菌的方法,灵敏度为 100 CFU/mL。染料型荧光定量PCR在细菌的快速检测中具有广阔的应用前景。

3 结论

该实验建立了一种利用SYBR Green I 荧光PCR反应,结合 H-NS 基因检测副溶血性弧菌的方法。其灵敏度可以达到 7.3×10 CFU/mL,在对30份实际

样品的检测过程中,该方法检测出了4份阳性样品,与国标法的检测结果一致。因此,建立起来的利用SYBR Green I 荧光定量PCR方法可应用于食品中副溶血性弧菌的快速检测。

参考文献

- [1] 李杰,卢昕,徐嘉良,等.应用SYBR Green I 荧光PCR方法快速检测溶藻弧菌[J].中国预防医学杂志,2014,15(3):195-198.
- [2] 覃倚莹,吴晖,肖性龙,等.*toxR* 基因作为荧光定量PCR靶基因设计TaqMan探针快速检测副溶血弧菌[J].生物工程学报,2008,24(10):1837-1842.
- [3] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等.水产品中副溶血性弧菌特异性二重PCR检测方法的研究[J].食品与机械,2008,24(3):90-93.
- [4] Muhammad Tofazzal Hossain, Young - Ok Kim, In - Soo Kong. Multiplex PCR for the detection and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* strains using the *groEL*, *tdh* and *trh* genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 27(2013):171-175.
- [5] Tove Atlung, Hanne Ingmer. H - NS: a modulator of environmentally regulated gene expression [J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(1):7-17.A
- [6] R.No, K.Okada, K.Kogure, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by PCR targeted to the histone-like nucleoid structure(H-NS) gene and its genetic characterization[J]. Letters in Applied Microbiology, 2011, 53:127-133.
- [7] 王昊宇,张公亮,侯红漫.应用SYBR Green I 溶解曲线检测食源性单增李斯特菌[J].食品工业科技,2013,34(10):77-79.
- [8] Anuj Tyagi, Saravanan V, Iddya Karunasagar, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in tropical shellfish by SYBR green I real-time PCR and evaluation of three enrichment media[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129(2):124-130.
- [9] Zhou S, Hou Z, Li N, et al. Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5):1897-1906.
- [10] Amy V Rizvi, Asim K Bej. Multiplexed real-time PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* and its rapid detection in shellfish and Gulf of Mexico water[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2010, 98:279-290.
- [11] Shuijing Yu, Wanyi Chen, Da peng Wang, et al. Species-specific PCR detection of the food-borne pathogen *Vibrio parahaemolyticus* using the *irgB* gene identified by comparative genomic analysis [J]. FEMS Microbiol Letters, 2010, 30(7):65-71.
- [12] Yoo Seok Jeong, Hee Kyoung Jung, Joo - Heon Hong. Multiplex real-time polymerase chain reaction for rapid detection of *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Salmonella typhimurium* in milk and kimchi [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2013, 56(6):

(下转第162页)

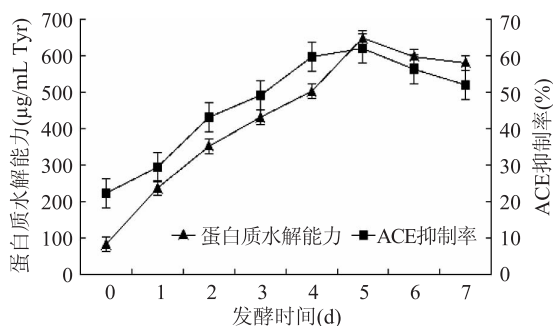


图5 菌株 QS306 的蛋白水解能力
与 ACE 抑制活性的关系

Fig.5 The relationship of Protein decomposition
and ACE inhibitory activity of QS306

抑制活性物质的含量也增加,使 ACE 抑制活性增强。

3 结论

3.1 *Lb.delbrueckii* QS306 在 10% 的还原脱脂牛乳中生长比较缓慢,产酸量和生物量逐渐上升,在 37 °C 培养第 4 d 时,滴定酸度和生物量分别达到 68.24(°T)和 6.91($OD_{410\text{nm}} \times 10$),此时的蛋白质水解能也达到了最大值 $623.21 \mu\text{g mL}^{-1}\text{Tyr}$ 。

3.2 核酸关联物质对 *Lb.delbrueckii* QS306 的蛋白质分解能力有一定的促进作用,其中添加鸟嘌呤(Guanine)时蛋白质水解能力提高了 43.7%。

3.3 随着发酵时间的延长,菌株 QS306 的蛋白水解能力和 ACE 抑制活性均逐渐上升,蛋白水解能力达到最高值 $647.48 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}\text{Tyr}$ 时,ACE 抑制活性可达 61.93%。发酵第 5 d 之后蛋白质水解能力和 ACE 抑制活性都有下降现象。表明,菌株 QS306 蛋白水解后所产生的游离氨基酸和寡肽中含有具有 ACE 抑制活性物质,并且其 ACE 抑制活性与水解产生的游离氨基酸和寡肽的含量呈正相关。

参考文献

- [1] 杨洁彬,郭兴华,傅晓丽,等.乳酸菌-生物学基础及应用[M].北京:中国轻工业出版社.1996:1-83.
- [2] 李平兰.乳酸菌细菌素研究进展[J].微生物学通报,1998,5:295-299.
- [3] Maruyama S, Suzuki H, A peptide inhibitor of angiotensin I

converting enzyme in the tryptichydrolysate of casein [J]. Agricultural Biological Chemistry, 1982, 46(5): 1393-1394.

[4] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, et al. Purification and Characterization of Angiotensin I—Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk [J]. J Dairy Science, 1995, 78: 777-783.

[5] Johnston J I, Franz V L. Renin—angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control [J]. J Hypertens, 1992, 10(S): 13-26.

[6] 王朝晖,程龙献,王祥,等.卡托普利注射液对高血压急症的降压作用[J].临床心血管病杂志,1998,14(4): 215-216.

[7] Hans M. Overview on milk protein—derived peptides [J]. Internat Dairy, 1998, 8(5): 363-373.

[8] Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats [J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(4): 776-778.

[9] Mgobetti, Ferranti P, Smacchi E. Production of angiotensin—I—converting—enzyme—inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* FT4 [J]. Appl Environm Microbio, 2000, 66(9): 3898-3904.

[10] 吕加平,董晓波,肖锐.发酵乳品中乳酸菌生物量测定方法的研究[J].肉品卫生,1997,(2): 3-7.

[11] Minervini F, Algaron F, Rizzello CG, et al. Angiotensin I—Converting Enzyme Inhibitory and Antibacterial Peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteins Hydrolyzed Caseins of Milk from Six Species [J]. American Society for Microbiology, 2003, 69: 5297-5305.

[12] 中島 昭正. 脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果 日本家政学会誌 47(11): 2007, 1085-1091.

[13] Hernández—Ledesma B, Miralles B, Amigo L, et al. Identification of antioxidant and ACE—inhibitory peptides in fermented milk [J]. J Food Agric Sci, 2005, 85: 1041-1048.

[14] Michaelidou A, Alichanidis E. Isolation and Identification of some major water—soluble peptides in feta cheese [J]. J Dairy Sci, 2011, 81: 3109-3116.

[15] 中島 昭正. 脱脂乳への核酸関連物質の添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果. 日本家政学会誌 48(1): 2008, 11-18.

[16] 商靚靚,陈卫,田丰伟,等.具有血管紧张素转换酶抑制活性的乳酸菌筛选及特性研究[J].中国乳品工业,2006,34(4): 24-28.

(上接第 158 页)

715-721.

[13] SN/T 3924-2014, 出口贝类中大肠菌群、粪大肠菌群检测方法[S].

[14] SN/T 1194-2014, 植物及其产品转基因成分检测[S].

[15] Blackstone G M, Noalsmxn J L, Viekerly M C, et al. Detection

of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real—time PCR [J]. Microbiol Methods, 2003, 53(2): 149-155.

[16] 蔡潭溪,蒋鲁岩,黄克,等.基于 Taq Man 探针的 Real—time PCR 技术定量检测副溶血弧菌[J].微生物学报,2005,45(4): 638-642.