(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106536748 A
(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201480076991.X

(22)申请日 2014.05.09

(30)优先权数据
10-2014-0004525 2014.01.14 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.09.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2014/004197 2014.05.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/108246 KO 2015.07.23

(71)申请人 崔元哲
地址 韩国京畿道
申请人 权宁娥 崔硕训 崔彰训

(72)发明人 崔元哲 权宁娥 崔彰训 崔硕训

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桉

(51)Int.Cl.
C12Q 1/24(2006.01)
C12N 1/00(2006.01)

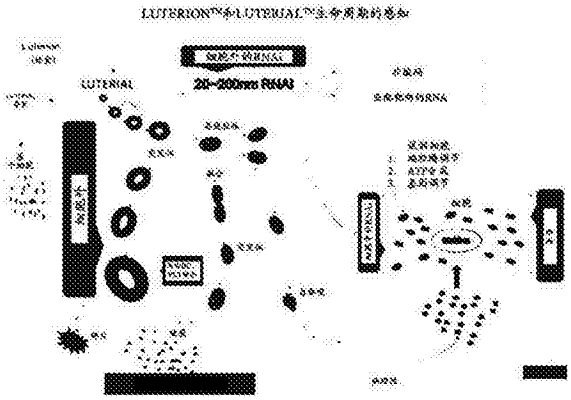
权利要求书2页 说明书26页
序列表5页 附图37页

(54)发明名称

Luterial和用于其分离及培养的方法

(57)摘要

本发明涉及源自血液的Luterial和用于分离和培养它的方法。根据本发明的Luterial是具有如下特征的细胞或细胞样结构:(1)其存在于体液,包括血液、精液、肠液、唾液和细胞流体中;(2)其在免疫荧光测试中显示用Janus绿B、吖啶橙和罗丹明123的阳性染色;(3)在最适条件(pH 7.2-7.4)下,其具有表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因的性质,且具有30-800nm的大小;(4)在酸性环境中,其具有不仅表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因,还表达源自真核生物的基因(特别是链型植物(Streptophyta)基因)的性质,且生长至400nm或更大至2000nm或更大的大小;(5)其在正常条件下参与ATP产生;和(6)其不同于线粒体,完全不同于外来体,且具有对应于原核生物和真核生物之间的中间体的那些的融合特征。



CN 106536748 A

1.一种用于分离Luterial的方法,包括步骤:

(a)去除血小板和具有大于来自血液的血小板的大小的源自血液的物质;

(b)离心血液从中去除血小板和所述源自血液的物质;

(c)从通过离心获得的上清分离Luterial;和

(d)洗涤分离的Luterial。

2.权利要求1的方法,其中所述血液源自哺乳动物。

3.权利要求2的方法,其中所述血液源自人。

4.权利要求1的方法,其中步骤(a)进一步包括使血液通过具有0.8-1.2μm孔径的过滤器并收集未通过所述过滤器的部分的步骤。

5.权利要求4的方法,其中通过顺序使用200nm、400nm、600nm、800nm和1000nm尺寸的过滤器根据尺寸将Luterial分成50-200nm、200-400nm、400-600nm、600-800nm和800-1,000nm。

6.权利要求1的方法,其中步骤(b)通过反复将所述血液以1,200-5,000rpm离心5-10分钟实施。

7.权利要求1的方法,其中外来体在步骤(b)中去除。

8.权利要求1的方法,其中步骤(c)通过将可见光照射至通过离心获得的上清和通过移液分离在可见光照射处的区域聚集的移动的Luterial颗粒实施。

9.权利要求1的方法,其中步骤(d)通过将在步骤(3)中分离的Luterial通过具有50nm孔径的过滤器并仅洗出未过滤的部分实施,由此获得Luterial。

10.源自体液的Luterial,其具有一个或多个下列特征:

(a)在荧光测试中显示用Janus绿B、吖啶橙和罗丹明123的阳性染色;

(b)在最适环境中(pH 7.2-7.4),表达与源自β-变形菌和源自γ-变形菌的基因同源的基因且具有30-800nm的大小;

(c)在酸性环境中,不仅表达与源自β-变形菌和源自γ-变形菌的基因同源的基因,还表达真核链型植物(Streptophyta)基因,且生长至400nm至2000nm或更大的大小;

(d)在正常条件下参与ATP产生;

(e)完全不同于线粒体或外来体的细胞或细胞样结构;

(f)正常状态中圆形或椭圆形,且源自患者的Luterial具有大于正常状态Luterial的尺寸(长轴直径:800nm或更大)且经突变以形成具有不均匀形态的突变体Luterial;

(g)具有多重环样层的膜结构且是粘附的;

(h)其可存在于细胞内或细胞外;

(i)其为移动的且经历融合和/或分裂事件;

(j)在某些环境中突变体Luterial破裂且在破裂后具有干性;和

(k)其具有调节p53基因和端粒的功能。

11.权利要求10的源自体液的Luterial,其中所述体液是源自哺乳动物的血液、精液、肠液、唾液或细胞流体。

12.一种培养Luterial的方法,其包括将水添加至根据权利要求10的分离的源自体液的Luterial并在18-30℃的温度在用IR光照射下培养。

13.权利要求12的方法,其中培养之前和之后,所述Luterial分别具有50-200nm和50-

800nm的大小。

14.权利要求13的方法，其中所述水是盐水或PBS溶液。

15.一种用于分离Luterial的方法，其包括步骤：

(a)分离体液以提供上清，并将所述上清过滤通过具有2-5μm孔径的过滤器；和

(b)离心过滤的溶液以获得上清，且将所述上清过滤通过具有0.5-2μm孔径的过滤器。

16.权利要求15的方法，进一步包括步骤(c)：将可见光照射至步骤(b)中经过滤的溶液并通过移液那些聚集在可见光照射区域的而分离移动的Luterial颗粒。

17.权利要求15的方法，其中所述体液是源自哺乳动物的血液、精液、肠液、唾液或细胞流体。

18.权利要求15的方法，其中步骤(a)中所述体液的离心在2,000-4,000rpm实施5-30分钟。

19.权利要求15的方法，其中步骤(b)中经过滤的溶液的离心以3,000-7,000rpm实施5-20分钟。

20.一种抗癌组合物，其包含权利要求10的Luterial作为活性成分。

Luterial和用于其分离及培养的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及作为源自体液的线粒体样未鉴定的纳米大小的颗粒的Luterial且涉及用于分离及培养它的方法。

背景技术

[0002] 血液中的微物质如微泡之前认为是不具有特定功能的物质。然而，多项实验数据已证明微泡也具有生物活性。例如，发现了源自血小板的微泡发挥功能以通过泡表面蛋白刺激一些细胞(CD154、RANTES和/或PF-4;Thromb.Haemost.(1999)82:794;J.Boil.Chem.(1999)274:7545)，且报导了血小板微泡中的生理活性脂质(例如HTET或花生四烯酸)对某些靶细胞具有一定的作用(J.Biol.Chem.(2001)276;19672;Cardiovasc.Res.(2001)49(5):88)。因此，由于存在于生物样品中的物质如泡的特征(例如大小、表面抗原、细胞来源的确定、有效载荷(payload))可提供诊断、预后或治疗诊断读出，对于鉴定可用于检测和治疗疾病的生物标记物仍存在需求。因此，已有尝试来使用RNA和其他与泡相关的生物标记物以及泡的特征以提供诊断、预后或治疗诊断(参见WO 2011/127219)。

[0003] 同时，癌症是其中细胞异常生长以干扰正常细胞功能的疾病，且其通常的实例包括肺癌、胃癌(GC)、乳腺癌(BRC)、直肠结肠癌(CRC)等，但癌症其实可发生于任何组织中。过去，癌症的诊断以通过癌细胞生长引起的生物组织的外部变化为基础，但近年来，已有尝试使用血液、生物组织或细胞中存在的痕量生物分子(乙二醇链、DNA等)实施诊断和检测。然而，最常用的癌症诊断方法是使用通过活检获得的组织样品或成像的诊断方法。然而活检在患者中引起巨大的疼痛，价格昂贵且对于癌症诊断需要很长时间。此外，如果患者具有癌症，癌症可在活检过程中转移，且在组织样品不能从其位点通过活检获得的情况中，存在疑似具有疾病的组织通过手术操作提取前不可能进行疾病的诊断的缺点。同时，在基于成像的诊断中，基于X射线成像、核磁共振(NMR)成像(采用具有附于其上的疾病靶向剂的成像剂)等诊断癌症。然而，该基于成像的诊断方法具有的缺点在于误诊可由于临床医师或解读医师的低技能而产生，且在于所述方法极大地依赖于成像装置的精确性。此外，基于成像的诊断方法具有的缺点在于：难以在早期检测疾病，因为甚至最精确的装置不能检测具有数mm或更小尺寸的肿瘤。此外，基于成像的方法具有的缺点在于：由于患者或疑似具有疾病的人暴露于用于成像的高能电磁波，其可引起基因突变，所述方法可引起另一种疾病，且在于通过成像诊断的次数是受限的。

[0004] 换言之，对于癌症诊断的活检是耗时、昂贵、不便的，且引起疼痛。由于此原因，对于能够显著减少非必需的活检步骤次数的方法以及能够在早期诊断癌症的方法存在需求。

[0005] 在这种情况下，本发明的发明人发现了疾病可通过观察在从患者排出的体液中存在的微物质的特征而诊断和预测。该发现内容在2013年7月12日提交了专利申请(韩国专利申请号10-2013-0082060)。本发明的发明人将该未鉴定的纳米大小的颗粒命名为"Luterial"。

[0006] 然而，有效分离和培养微物质Luterial从而能够进行临床应用的技术尚不知晓。

[0007] 因此，本发明的发明人开发了一种能够有效分离存在于自患者或正常人排出的体液中的未鉴定的纳米大小颗粒Luterial的方法，并表征了通过该方法分离的Luterial，由此完成了本发明。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本发明的目的是提供用于分离和培养在从患者或正常人排出的体液中存在的Luterial的方法。

[0010] 本发明的另一目的是提供Luterial，其具有对应于原核生物和真核生物之间的中间体的那些的整合性特征，显示与Janus绿B、Mitotracker红和罗丹明123的阳性荧光染色反应，是移动的，且具有产生ATP的能力。

[0011] 技术方案

[0012] 为实现上述目的，本发明提供了用于分离Luterial的方法，其包括步骤：分离血小板和具有大于来自血液的血小板的大小的源自血液的物质；离心去除血小板和具有大于血小板的大小的源自血液的物质后获得的血液级分；通过收集离心后的上清分离Luterial；和(4)洗涤分离的Luterial。

[0013] 本发明还提供用于分离Luterial的方法，其包括步骤：离心体液以提供上清，并将上清过滤通过具有2-5μm孔径的过滤器，由此获得经过滤的溶液；并离心经过滤的溶液以提供上清，且将上清过滤通过具有0.5-2μm孔径的过滤器。

[0014] 本发明还提供源自体液的Luterial，其具有一个或多个下列特征：

[0015] (a)在荧光测试中其显示与Janus绿B、吖啶橙和罗丹明123的阳性染色反应；

[0016] (b)在最适环境中(pH 7.2-7.4)，其表达源自β-变形菌和源自γ-变形菌的基因且具有30-800nm的大小；

[0017] (c)在酸性环境中，其不仅表达源自β-变形菌和源自γ-变形菌的基因，还表达源自真核链型植物(Streptophyta)基因，且生长至400nm至2000nm或更大的大小；

[0018] (d)在正常条件下参与ATP产生；

[0019] (e)其为完全不同于线粒体或外来体的细胞或细胞样结构；

[0020] (f)其在正常状态中为圆形或椭圆形，且源自患者的Luterial具有大于正常状态的Luterial的大小(长轴直径：800nm或更大)，且经突变以形成具有不均匀形态的突变体Luterial；

[0021] (g)其具有多重环样膜且是粘附的；

[0022] (h)其可存在于细胞内或细胞外；

[0023] (i)其为移动的且经历融合和/或分裂事件；

[0024] (j)在某些条件下突变体Luterial破裂且在破裂后具有干性(stemness)；和

[0025] (k)其具有调节p53基因和端粒的功能。

[0026] 本发明还提供用于培养Luterial的方法，其包括：将水添加至分离的源自体液的Luterial并在18-30℃的温度在用IR光照射下培养所述Luterial。

[0027] 本发明还提供含有Luterial作为活性成分的抗癌复合物。

[0028] 附图简述

[0029] 图1显示用共聚焦激光扫描显微镜(Zeiss)、透射电子显微镜、扫描电子显微镜、原子力显微镜和共聚焦扫描仪(Leica TCS-SP8)成像的源自血液的未鉴定的纳米大小颗粒Luterial的图像。

[0030] 图2描述的图像显示具有多种大小的Luterial的形状和形态:((a):39.6-49.0nm,用Mito-tracker红染色后的超高分辨率显微镜(SR-GSD)图像;(b):50.1-85.1nm,用Mito-tracker红染色后的超高分辨率显微镜(SR-GSD)图像;(c):76.5nm,透射电子显微镜图像;(d):160nm,透射电子显微镜图像;(e):170-230nm,透射电子显微镜图像,多重膜结构;(f):234nm,用Janus绿B染色后的图像;(g):250nm,原子力显微镜图像;(h):361nm,透射电子显微镜图像;(i):650.1nm,透射电子显微镜图像;和(j):用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染色后具有5μm或更大大小的Luterial的激光扫描显微镜图像。

[0031] 图3的图像显示用罗丹明123染色Luterial且随后观察Luterial是否阳性染色的结果。

[0032] 图4的图像显示用Mito-tracker染色Luterial且随后观察Luterial是否阳性染色的结果。

[0033] 图5的图像显示用吖啶橙染色Luterial且随后观察Luterial是否阳性染色的结果。

[0034] 图6的图像显示用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染色Luterial且随后观察Luterial是否阳性染色的结果。

[0035] 图7描述的图像显示使用纳米追踪剂测量Luterial移动性的结果((a)测量前;(b)1秒后;(c)3秒后)。

[0036] 图8显示正常Luterial的生命周期A和突变的Luterial的生命周期B。

[0037] 图9显示突变的Luterial的生命周期和特征。

[0038] 图10显示从癌症患者体液分离的Luterial。具体地,图10(a)显示形成伸长的分支时源自癌症患者的Luterial,且图10(b)显示用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)、Mito-tracker和罗丹明123染色的源自癌症患者的Luterial。

[0039] 图11显示Luterial的生命周期。

[0040] 图12的图像显示测量Luterial和突变的Luterial的大小的结果。

[0041] 图13描述的图像显示用原子力显微镜探针刮擦Luterial并去除膜的结果。

[0042] 图14(a)和14(b)为融合状态的突变Luterial的原子力显微镜图像,且图14(c)和14(d)显示用悬臂剥离膜后由原子力显微镜成像突变的Luterial的结果。

[0043] 图15描述的图像显示用原子力显微镜探针刮擦Luterial且随后通过DAPI染色图像观察DNA的结果。

[0044] 图16(a)显示分析Luterial是否包含DNA的生物分析仪结果。

[0045] 图16(b)显示qRT-PCR的结果,其指示DNA的GAPDH基因表达依赖于Luterial的大小而改变。

[0046] 图17显示分析Luterial是否包含DNA的生物分析仪结果。

[0047] 图18显示通过使用荧光素-荧光素酶反应和发光计在具有添加的不同Luterial的介质中测量ATP含量的结果(SSH:三星环;SSF:漆黄素(fisetin);12h:实验前在37℃激活12小时)。

[0048] 图19是显示Luterial和外来体之间差异的图。图19中，外来体具有20-120nm的大小，不清晰的膜和相对浅的内部颜色，而Luterial具有50-800nm的大小和独特的膜或经包装的内部结构。

[0049] 图20描述的照片比较了Luterial、外来体和微泡间的形态。

[0050] 图21描述了本发明实施例中所述的Luterial文库的透射电子显微镜(TEM)的图像。

[0051] 图22描述了显示由培养引起的Luterial大小改变的共聚焦激光扫描显微镜的图像。

[0052] 图23描述的图像显示通过培养引起的Luterial大小和形态改变。

[0053] 图24显示Luterial DNA的细菌同源性百分比，如通过对源自健康人的血液(血液pH:7.2-7.4)的具有多种尺寸的Luterial的16S rRNA测序确定的((a):100nm或更小；(b):100-200nm；(c):200-400nm；(d):400-800nm)。

[0054] 图25显示Luterial DNA的细菌同源性百分比，如通过对源自疲劳和疾病状态的血液和精液(pH:7.0或更低)的具有多种尺寸的Luterial的16S rRNA测序确定的((a):100nm或更小；(b):100-200nm；(c):200-400nm；(d):400-800nm)。

[0055] 图26(a)、26(b)和26(c)显示基于源自血液的Luterial的16S rRNA序列的进化树。

[0056] 图27显示用多种浓度的具有100-800nm大小的Luterial和商业可获得的抗癌药顺铂处理卵巢癌细胞系(SKOV3和A2780)后通过MTT测定法测量的细胞活力。

[0057] 实施本发明的最佳模式

[0058] 除非另外定义，本文使用的全部技术和科学术语与本发明所属领域的技术人员所理解具有相同的含义。一般而言，将在下文描述的本文使用的命名法和实验方法为本发明所述技术领域熟知且通常采用的那些。

[0059] 如本文使用，由本发明的发明人命名的术语"Luterial"指存在于动物中的活生物体且意为具有与约800nm的病毒大小相似的大小的精细物质(在正常分裂阶段50-800nm/在异常融合阶段800nm或更大)。Luterial具有下列特征：(1)其为具有对应于原核生物和真核生物之间的中间体的那些的整合性特征的细胞或细胞样结构；(2)其存在于体液(包括血液、精液、肠液、唾液、细胞流体等)中；(3)其在荧光染色测试中显示用Janus绿B、吖啶橙和罗丹明123的阳性染色反应；(4)在最适环境中(pH 7.2-7.4)，其具有表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因的性质且具有30-800nm的大小；(5)在酸性环境中，其不仅表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因且还表达真核基因(特别是链型植物基因)，且生长至400nm至2000nm或更大的大小；(6)在正常条件下其参与ATP产生；和(7)其为不同于线粒体且完全不同于外来体的细胞或细胞样结构。在哺乳动物(包括人)的情况中，Luterial存在于血液、唾液、淋巴管、精液、阴道流体、母乳(特别是初乳)、脐带血、脑细胞、脊髓和骨髓。此外，在有角动物的情况中，Luterial还存在于角中。

[0060] 正常的Luterial具有50-800nm的大小，且通过融合形成的突变体Luterial具有数十微米的大小。术语“Luterial”可指包含mRNA、miRNA和DNA的原线粒体(proto mitochondria)。Luterial的独特之处在于其不溶于消化液且浸润入血液。

[0061] 预期Luterial不仅与信号转导、细胞分化和细胞死亡密切相关，其还与细胞周期和细胞生长的调节密切相关。本发明的发明人已发现Luterial与癌症的诊断密切相关。

[0062] 正常的Luterial预期发挥功能以预防癌细胞的生长并使细胞回复至健康的免疫状态，且其功能通过起作用以标准化基因的RNAi(RNA干扰)活性实施。当健康人或动物血液中的RNAi信息系统偏离正常状态并指导以产生引起异常疾病的蛋白时，Luterial会故意干扰信息系统从而抑制疾病如癌症的发展。当Luterial生长至200-500nm或更大的大小时，其也会参与能量代谢，且当用具有一定波长的光照射Luterial时，其会发挥功能以扩增光能量作为响应并将如叶绿体般发挥作用。因此，如果Luterial未实施正常功能，其可引起稳态平衡和ATP产生方面的严重病症且可引起呼吸和能量代谢两者中的疾病。

[0063] 不能实施如上文所述的正常功能的突变体Luterial显示不同于正常Luterial的现象和特征且具有多种尺寸和形状。具体地，正常Luterial在其形成双孢子后停止生长，但在癌症患者或具有慢性疾病的患者的血液中发现的突变体Luterial具有无限生长的特征，与干细胞相似，且因此具有600-800nm至200μm(200,000nm)或甚至更大的尺寸。此外，与病毒相似的是，Luterial显示可进入红细胞、白细胞、血小板等或在其内生长或与其他Luterial聚集的独特的特征。

[0064] 因此，预期可通过观察Luterial的形态学或生化特征来诊断或治疗疾病且由此确保了其在众多应用中的广泛用途。然而，分离自从动物(包括人)排出的体液的Luterial难以观察，因为其在体外迅速解体或经历形态变化。此外由于正常Luterial在24小时内于异常环境下变为突变体Luterial，这使其难以精确诊断或治疗疾病。

[0065] 在本发明中，存在于分离自患者或正常人体液中的未鉴定的纳米大小颗粒Luterial通过两种方法分离。

[0066] 因此，一方面，本发明涉及分离来自体液的Luterial的方法。

[0067] 根据本发明的第一种方法是用于从血液分离的Luterial的方法，其包括步骤：(1)分离血小板和具有大于来自血液的血小板的大小的源自血液的物质；(2)去除血小板和具有大于来自血液的血小板的大小的源自血液的物质后离心血液；(3)从离心所获的上清分离Luterial；并(4)洗涤分离的Luterial。

[0068] 步骤(1)可包括使血液通过具有0.8-1.2μm孔径的过滤器并去除未过滤的物质的步骤。步骤(2)可包括以1,200-5,000rpm反复离心血液5-10分钟以去除一般的微泡如外来体并回收上清的步骤。步骤(3)可包括将可见光照射至通过离心所获的上清并通过移液分离朝光聚集的移动的Luterial颗粒的步骤。步骤(1)中使用的血液可源自哺乳动物中的人。Luterial是自发荧光且移动的，且因此上清中的Luterial颗粒可在暗视野显微镜或共聚焦显微镜下由可见光照射协助通过移液可见的Luterial而分离。步骤(3)中分离的Luterial可通过具有50nm孔径的过滤器，且未过滤的部分可用PBS洗出用于Luterial的分离。因为Luterial具有50nm或更大的长轴直径，小于Luterial的源自血液的物质可通过上述步骤去除。

[0069] 根据本发明的第二方法是用于从体液如血液或精液分离Luterial的方法，其包括步骤：离心体液以提供上清，并将上清过滤通过具有2-5μm孔径的过滤器，由此获得经过滤的溶液；离心经过滤的溶液以提供上清，并将上清过滤通过具有0.5-2μm孔径的过滤器。

[0070] 具体地，第二方法可包括步骤：以2,000-4,000rpm离心体液5-30分钟以提供上清，并将上清过滤通过具有2-5μm孔径的过滤器；并以3,000-7,000rpm离心过滤的溶液5-20分钟，随后过滤通过具有0.5-2μm孔径的过滤器。

[0071] 第二方法可进一步包括将可见光照射至过滤的溶液并通过移液分离朝光聚集的移动的Luterial颗粒的步骤。本文中，Luterial是自发荧光且是移动的，且因此上清中的Luterial颗粒可通过用可见光照射可视化。分离的Luterial可通过具有50nm孔径的过滤器，且未过滤的部分可用PBS洗出，由此获得Luterial。由于Luterial具有50nm或更大的长轴直径，小于Luterial的源自血液的物质可通过上述步骤去除。

[0072] 由这两种方法中的每一种分离的Luterial可通过暗视野显微镜或共聚焦显微镜观察，且可通过顺序使用200nm、400nm、600nm、800nm和1000nm过滤器根据大小分成50-200nm(发育期)/200-400nm(成熟期)/400-600nm(有丝分裂期)/600-800nm(超过有丝分裂期)。

[0073] 在本发明中，表征了分离的Luterial。

[0074] (1)形态学

[0075] 发现正常的Luterial具有50-800nm的大小(图2和12)，且在不存在异常融合的情况下生长至800nm的大小。源自患者的Luterial具有大于源自健康人Luterial的大小(800nm或更大的长轴直径)，其经突变形成具有不均一形态的突变体Luterial，且当异常融合持续时生长至数千nm的大小。

[0076] 此外，Luterial的形状为圆形或椭圆形，且在SEM或TEM图像中显示多重环样膜结构，但不具有内部嵴结构(图1)。

[0077] (2)荧光染色

[0078] 已知线粒体由Janus绿B和荧光染料(包括罗丹明123、Mitotracker、吖啶橙和DAPI)阳性染色，且发现Luterial还通过与用于线粒体的那些相同的染料染色。荧光图像指示Luterial而非外来体在荧光染色测试中显示与线粒体相似的反应且显示自发荧光(图2(a)、2(b)、2(f)和2(j)，和图3-6)。

[0079] (3)性质

[0080] 与外来体和微泡不同的是，Luterial是粘附和移动的且经历了融合或分裂事件。发现突变体Luterial在一些条件下破裂，破裂后具有干性，且可在细胞内或细胞外存在(图8、9和11)。

[0081] (4)ATP产生

[0082] 具有200-400nm大小的Luterial中ATP的产生使用荧光素-荧光素酶反应和发光计证明。包含Luterial的介质相比无Luterial的介质显示ATP浓度的增加，指示Luterial具有产生ATP的能力。将SSH和SSF进一步添加至介质并检查了其通过Luterial对ATP产生的影响。相比具有SSH的介质，包含SSF的介质通过Luterial诱导更高的ATP产生，因此发现能够通过Luterial有效增加ATP产生的介质混合物(图18)。

[0083] (5)核酸含量

[0084] 通过DAPI和吖啶橙(AO)染色发现Luterial不仅包含RNA还包含DNA。具体地，已知AO在460nm的激发波长和650nm的发射波长以橙色AO染色RNA，且在502nm的激发波长和525nm的发射波长以绿色染色DNA。已知DAPI对DNA阳性染色。使用如上文所述的染色测试确认根据本发明的Luterial包含RNA和DNA(图5和6)。Luterial中的RNA进一步使用提取试剂盒分离和纯化，且随后在针对人GAPDH基因转录物的qRT-PCR后进行琼脂糖凝胶电泳。发现人GAPDH基因的表达水平依赖于Luterial的大小而变化(图2(h)，16和17)。

[0085] (6)16S rRNA测序

[0086] 使用FastDNA SPIN试剂盒(MP Biomedicals,Cat 6560-200)提取Luterial的gDNA,且随后使用示于下文表1和2中的引物扩增16S rRNA基因。

[0087] 此外,使用GenBank数据库(NCB数据库)对1461个扩增的基因片段的同源性进行了分析。结果,源自血液和精液的Luterial显示与源自β-变形菌、γ-变形菌、酸杆菌(Acidobacteria)、蓝藻(Cyanobacteria)、放线菌(Actinobacteria)、厚壁菌(Firmicutes)和真核生物的基因的那些具有同源性的16S rRNA序列,且显示对应于原核生物和真核生物之间的中间体的那些的整合特征(图24和25)。

[0088] 观察到在最佳条件中(血液pH:7.2-7.4),源自血液的Luterial显示与源自β-变形菌和γ-变形菌的基因的同源性(图24)且具有50-800nm的大小。

[0089] 在正常条件下,源自精液的Luterial显示与源自β-变形菌和γ-变形菌、拟杆菌(Bacteroidetes)和脊索动物(Chordata)的基因的同源性。

[0090] 与之相反,在酸性条件中,不仅在正常条件中表达源自β-变形菌和γ-变形菌的基因,还表达其他不同的源自细菌的基因和源自真核生物的基因。Luterial主要表达链型植物和浮霉菌(planctomy)的16S rRNA特征(图25)且生长至400-2000nm。

[0091] 表1:正向引物

[0092]

分类	名称	序列(适配体-核心-接头-靶序列)	SEQ ID NO:
细菌	B16S-F	5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	1

[0093]

双歧杆菌	Bif16S-F	5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GGGTTCGATTCTGGCTCAG-3'	2

[0094] 表2:反向引物

[0095]

分类	名称	序列(适配体-核心-接头-靶序列)	SEQ ID NO:
细菌	B16-7-4	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGAGCTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	3
细菌	B16-7-7	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCAGATG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	4
细菌	B16-7-8	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CGATGAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	5
细菌	B16-7-12	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCTGCAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	6
细菌	B16-7-13	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGCGATG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	7
细菌	B16-8-3	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATGCTGAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	8
细菌	B16-8-4	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TACAGCAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	9
细菌	B16-8-18	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATCGTGTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	10
细菌	B16-8-21	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTACACAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	11
细菌	B16-9-4	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CGTGTACTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	12
细菌	B16-9-5	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTGTCTACG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	13
细菌	B16-9-8	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTCACTAG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	14
细菌	B16-9-12	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGCTCACTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	15
细菌	B16-10-6	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATCACGTGCG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	16
细菌	B16-10-7	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATAGCTCTCG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	17
细菌	B16-10-8	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTGAGCTCG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	18
细菌	B16-10-9	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTCTGACTG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	19

[0096]

细菌	B16-11-1	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCATATACGCG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	20
细菌	B16-11-2	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TAGATAGTGCG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	21
细菌	B16-11-3	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ACGTCTCTACG-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	22
细菌	B16-11-4	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTAGAGACACT-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3'	23

[0097] (7)与外来体和线粒体的差异

[0098] 下文表3总结了Luterial与外来体和线粒体的差异。

[0099] 表3

[0100]

No.	分类	外来体	Luterial	线粒体
1	大小	20~120nm	50~800nm	400~1,000nm
2	荧光	(CD63 抗体)GFP+	(CD63 抗体)GFP -	(CD63 抗体)GFP-
3	荧光	Mitotracker 红 -	Mitotracker 红+	Mitotracker 红+
4	荧光	Janus 绿 B -	Janus 绿 B+	Janus 绿 B+
5	荧光	罗丹明 123 -	罗丹明 123+	罗丹明 123+
6	移动性	-	13~25 μm/秒	-
7	培养中的生长	-	+	-
8	自然生长	-	+	-
9	ATP 合成	-	+	+
10	自发荧光	-	+	N/A
11	融合	+	+	+
12	接触和分开(分裂和融合)	-	+	+
13	测序	18SrRNA 28S rRNA	16SrRNA (γ 变形菌 β 变形菌 拟杆菌	16srRNA Alpha 变形菌
14	栖息地	细胞外	细胞内和外	细胞中

[0101] Luterial具有200-800nm的平均大小,其小于线粒体(400-1,000nm)且大于外来体,且外来体具有不清楚的膜和相对淡的内部颜色,而Luterial具有独特的膜或经包装的内部结构(图19)。此外,Luterial具有完全不同于外来体和微泡的那些的形态(图20)。

[0102] 在荧光染色中,与外来体不同的是,Luterial显示与线粒体相似的反应。Luterial存在于细胞内和细胞外而外来体仅存在于细胞外。Luterial可通过摄入食物供给,而线粒体是不可通过摄入食物提供的细胞内物质。

[0103] 此外,与外来体和线粒体不同的是,Luterial是移动的,且可自然生长,其生长可

通过培养维持，并显示自发荧光。此外，Luterial、外来体和线粒体都经历融合事件，但在外来体中，无接触和分开的动作及ATP产生。而且，外来体存在于细胞外且线粒体存在于细胞内，而Luterial可存在于细胞内或细胞外(图11)。

[0104] 16S rRNA测序的结果指示线粒体显示与α-变形菌的同源性，而Luterial显示与γ-变形菌、β-变形菌、拟杆菌、厚壁菌和真核生物的同源性。

[0105] 另一方面，本发明聚焦于源自体液的Luterial，其具有一个或多个下列特征：

[0106] (a)其在荧光测试中显示用Janus绿B、吖啶橙和罗丹明123的阳性染色；

[0107] (b)在最适环境中(pH 7.2-7.4)，其表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因且具有30-800nm的大小；

[0108] (c)在酸性环境中，其不仅表达与β-变形菌和γ-变形菌同源的基因且还表达与真核链型植物同源的基因，且生长至400nm-2000nm或更大的大小；

[0109] (d)其在正常条件下参与ATP产生；

[0110] (e)其为完全不同于线粒体或外来体的细胞或细胞样结构；

[0111] (f)其在正常状态中为圆形或椭圆形，且源自患者的Luterial具有大于正常状态的Luterial的尺寸(长轴直径:800nm或更大)且经突变以形成具有不均匀形态的突变体Luterial；

[0112] (g)其具有多重环样膜结构-且是粘附的；

[0113] (h)其可存在于细胞内或细胞外；

[0114] (i)其为移动的且经历融合和/或分裂事件；

[0115] (j)在某些环境中突变体Luterial破裂且在破裂后具有干性；和

[0116] (k)其具有调节p53基因和端粒的功能。

[0117] 同时，Luterial的大小(直径)、面积、形态和纳米追踪速度取决于个体中疾病的存在或不存在而不同，且因此上述的一个或多个特征使得诊断疾病或预测疾病预后成为可能。这可由下列事实可见：源自无疾病的健康人的Luterial和源自具有疾病的人的Luterial具有不同的大小、形态、纳米追踪速度等。

[0118] 健康人中的正常Luterial仅形成经历分裂的双孢子，但具有慢性疾病或癌症的患者中的Luterial(突变体Luterial)具有下列特征：其彼此融合或凝集或破裂以粘附至细胞如红细胞或癌细胞，由此异常地改变其形态和大小(图8-10)。突变体Luterial是高度粘度的，且因此其融合通过上述周期加速以将其大小增加至约600-800nm或更大，且任何这样的突变体Luterial也可具有200μm(200,000nm)或更大的大小。本发明的发明人发现Luterial的形态取决于癌症的种类或进展是一致的，且此发现的内容提交了专利申请(韩国专利申请号10-2013-0082060)。

[0119] 因此，可能通过观察Luterial的形态和生化特征来诊断疾病或预测疾病预后，指示Luterial可在不受限制的应用中使用。

[0120] Luterial具有正常形、鞭毛形、块型、棒形或组合形。本文中，正常形可以是不经历额外修饰如融合或破裂的形式，具有1:1-3:1的长轴直径对短轴直径比率。Luterial可显示接近圆形的形状。其在显微镜观察中作为小点出现。

[0121] 鞭毛形可以是由Luterial的修饰或融合以具有附着在外的鞭毛样结构所致的形式。本发明的发明人发现鞭毛形的百分比随癌症进展至晚期癌症急剧增加且该鞭毛形

Luterial在99.1％的诊断为4期癌症的患者中观察到(韩国专利申请号2013-0082060)。如果鞭毛形Luterial的百分比达到80-100％,其会作为肿瘤标记物以指示末期癌症。这样的患者的生存期为约1-4个月,且特别地,主要具有鞭毛形Luterial的患者不能长期生存。

[0122] 块形(M形状)是由于Luterial的破裂或融合从正常形所变的形式。其为不规则的大体积形状,其长轴直径对短轴直径的比率不大。优选地,其可具有3:1-5:1的长轴直径对短轴直径比率。观察到块形的多种形式。

[0123] 棒形(R形状)指由Luterial的破裂、修饰或融合导致的形式。其具有大于块形的长轴直径对短轴直径比率。优选地,其可具有5:1-12:1的长轴直径对短轴直径比率。其包括圆形或椭圆形单链组成的棒1形;和由两条或多条单链彼此结合组成的棒2形。棒1形指生长至棒状的单个Luterial。其可由破裂和/或突变导致。棒2形指由两个或多个Luterial的融合形成的棒状Luterial。其可由一次或多次破裂、突变和融合导致。鞭毛形在广义上可包括在棒形范围内,但其与棒形的不同在于其具有鞭毛样结构。因此,Luterial形式应首先确定其是否为棒形且随后取决于鞭毛样结构的存在进一步归类于鞭毛形。

[0124] 组合形可以是棒状和块状的组合。其可意为单微颗粒物质的一部分具有棒状且其其他部分具有块状。

[0125] 棒形可以是选自下组的一种:由单圆形或椭圆形组成的棒1形;和由两条或多条单链彼此结合组成的棒2形。组合形可以是棒状和块状的组合。

[0126] 如上文所述,体内Luterial的形态依赖于疾病的发生和进展而改变,且因此可通过观察Luterial的形态特征来诊断疾病或预测疾病预后。此外,Luterial的形态变化也与Luterial序列及Luterial中的核酸含量的变化相关,且因此使得能够从Luterial的核酸表达形式分析(16S rRNA测序)对疾病进行诊断。例如,可能通过将正常Luterial的16S rRNA序列与源自患者的Luterial的16S rRNA序列进行比较诊断疾病(特别是癌症)。具体地,Streptopyta基因和真核生物基因的共表达可用作诊断和预测致癌作用的标记物。

[0127] 然而,分离自从患者或正常人排出的体液的Luterial难以观察,这是由于其在体外在短时间趋于消失或改变其形状。此外,在异常环境中,正常Luterial在24小时内变为突变体Luterial,使其难以精确诊断或治疗疾病。然而,根据本发明的培养方法,可培养Luterial使得其大小不超过一定的尺寸(500nm)。

[0128] 因此,另一方面,本发明涉及用于培养Luterial的方法,其包括:添加水至Luterial;并在18-30℃(优选20-25℃)的温度在用IR光照射下培养Luterial。

[0129] 添加至培养过程的水可以为盐水或PBS溶液,但不限于此。培养前源自体液的Luterial可根据本发明的分离方法获得且可具有50-200nm的大小。根据本发明的培养方法培养的Luterial可具有300-800nm的大小。本文中,可将Luterial控制在显微镜观察下500nm或更小的尺寸。完成培养后,Luterial可根据大小分选,并冷却和保存在-80℃或保存在氮气下或可在高于零的温度保存。对于保存,可将防腐剂添加至Luterial。

[0130] 如上文所述培养的Luterial可保存一定的时间段而不改变Luterial的特征,且可有效用于诊断疾病和预测疾病预后。如本文使用,表述“不改变Luterial的特征”意为Luterial的形态或大小维持在与在介质中培养前相似的水平。此外,其意为Luterial的活性如移动性(例如纳米追踪速度)维持在与培养前相似的值。

[0131] 具体地,根据本发明的培养方法培养的Luterial可出于下列目的使用。突变体

Luterial由于融合或凝集具有异常增加的形态或大小，与正常Luterial不同(图8-10)。通过培养突变体Luterial，能够抑制或防止Luterial突变的物质可从候选物质中通过观察培养的Luterial突变体是否变化而进行筛选。

[0132] 此外，促进突变体Luterial分裂的物质可通过用候选物质或手段处理培养的突变体Luterial而筛选。由于突变体Luterial显示融合类型或凝集事件(图8、9和11)，通过用候选物质处理突变体Luterial并检查其是否促进突变体Luterial的分裂以具有正常Luterial的大小，可能筛选抑制Luterial突变或将突变体Luterial转变为正常Luterial的物质，即预防由突变体Luterial导致的疾病的物质。

实施例

[0133] 此后，本发明将进一步参照实施例进行描述。对本领域的技术人员显而易见的是这些实施例仅出于阐述目的且不应理解为限制本发明的范围。因此，本发明实质范围将通过所附权利要求及其等同物限定。

[0134] 实施例1:源自血液的Luterial的分离

[0135] 从非小细胞肺癌患者收集50cc的血液并通过具有0.8μm或更大孔径的过滤器，并去除未过滤的物质。过滤的血液反复以1,200-5,000rpm离心5-10分钟以去除一般的微泡如沉淀中收集的外来体，并收集上清。用可见光照射上清，并通过移液分离具有移动性的聚集的Luterial颗粒。由于Luterial是自发荧光和移动的，Luterial颗粒可如上文所述通过用可见光照射可视化。此时，移动的Luterial颗粒在暗视野显微镜或共聚焦显微镜的观察下通过移液分离。将分离的Luterial过滤通过具有50nm孔径的过滤器，并仅将未过滤的部分用PBS洗涤，由此获得Luterial。根据上述步骤，可获得具有50-800nm长轴直径的Luterial，其可通过暗视野显微镜或共聚焦显微镜观察。获得的Luterial根据大小分选成50-200nm(发育期)/200-400nm(成熟期)/400-600nm(有丝分裂期)/600-800nm(超过有丝分裂期)。根据相似的方法，构建了如图21所示的具有多种大小的Luterial的文库，且具有多种大小的Luterial的形态示于图2中。

[0136] 实施例2:源自精液的Luterial的分离

[0137] 将精液以2000-4000rpm离心5-30分钟，且将上清过滤通过具有2-5μm孔径的过滤器。过滤的溶液以3000-7000rpm离心5-20分钟，随后过滤通过具有0.5-2μm的孔径的过滤器。由于Luterial是自发荧光和移动的，当过滤的溶液用可见光照射时能够可视化Luterial颗粒。此时，移动的Luterial颗粒在暗视野显微镜或共聚焦显微镜的观察下通过移液分离。将分离的Luterial过滤通过具有50nm孔径的过滤器，并仅将未过滤的部分用PBS洗涤，由此获得可通过暗视野显微镜或共聚焦显微镜观察的Luterial。

[0138] 实施例3:Luterial的特征

[0139] (1)结构

[0140] 实施例1中获得的Luterial中，具有约50-400nm大小的Luterial用共聚焦激光扫描显微镜(Zeiss)、透射电子显微镜、扫描电子显微镜、原子力显微镜和共聚焦扫描仪(Leica TCS-SP8)成像。结果是，显示Luterial还具有多重环样层的膜结构和不完全的内部嵴结构，与线粒体相似，且在与用于线粒体的波长相同的范围中观察。此外，可观察到Luterial为圆形或椭圆形状(图1、1(e)、2(h)、13和14)。

[0141] (2)染色特征

[0142] 实施例1中获得的Luterial中，具有约50-800nm大小的Luterial用Mito-tracker、罗丹明123、吖啶橙和Janus绿B染色，并测试它们的阳性染色。结果显示甚至源自植物的Luterial也通过Mito-tracker、罗丹明123、吖啶橙和Janus绿B染色(图2(a)、2(b)、2(f)和2(j)，和图3-6)。

[0143] (3)自发荧光

[0144] 实施例1中获得的Luterial中，具有约50-800nm大小的Luterial通过荧光图像分析。结果显示Luterial对光响应(图5)。

[0145] (4)移动性

[0146] 实施例1中获得的Luterial的移动性通过纳米追踪(3i Inc.,USA)分析而测量。具体地，用亮视野显微镜观察Luterial，在Luterial的中心设置追踪并实施纳米追踪。随后，记录Luterial的实时运动轨道并计算Luterial的速度每秒(图7)。

[0147] 结果是，根据本发明的Luterial的纳米追踪速度测量为约13-25μm/秒。

[0148] (5)Luterial是否包含RNA和DNA的分析

[0149] 实施例1中分离的具有200-400nm大小的Luterial用原子力显微镜成像。如图2(h)、15、16和17所示，Luterial包含核酸如RNA或DNA。

[0150] 为从实施例1中分离的具有200-400nm大小的Luterial分离总RNA和DNA，使用了QIAGEN试剂盒(RNeasy Micro Kit:目录号74004)，随后使用Experion RNA(DNA)StdSens(Bio-Rad)芯片量化。

[0151] Luterial通过离心(以8,000g进行1小时30分钟)回收，且随后通过添加与3.5μl β-巯基乙醇混合的来自试剂盒的50μl裂解缓冲液RLT加(异硫氰酸胍，洗涤剂)裂解，且随后使其通过装配了20号(gauge)针头的注射器5-10次。随后将样品裂解缓冲液转移至AllPrep DNA离心柱，随后离心(以≥8000g进行15秒)以将残留在柱上的DNA与经过柱的缓冲液中包含的RNA分离。

[0152] 接下来，将350μl的70％乙醇添加至相同体积的样品裂解缓冲液，所述缓冲液穿过柱(RNA)并充分混合。随后将700μl的混合物转移至RNease MinElute离心柱并离心(以≥8000g进行15秒)，并去除通过柱的缓冲液。顺序用350μl的RW1、500μl的RPE缓冲液和500μl 80％的乙醇洗涤柱。在相同条件下实施如上文所述使用的全部离心步骤(≥8000g进行15秒)。为获得RNA，将14μl的无RNeasy的溶液添加至柱并随后离心(以≥8000g进行60秒)，由此分离Luterial RNA。

[0153] 对于基因组DNA(gDNA)的分离，使用了FastDNA SPIN试剂盒(MP Biomedical)。将分离的Luterial添加至管，随后添加978μl的磷酸钠缓冲液和122μl的MT缓冲液。将混合物匀质化40秒，且随后以14,000g离心10分钟以收集上清，其后将250μl的PPS(蛋白沉淀溶液)添加至上清并混合10分钟。以14,000g离心5分钟后，将上清转移入15ml管，并重复该步骤两次。对于DNA结合，将所得上清置于转子上2分钟，且随后置于二氧化硅基质支持物上3分钟。将600μl上清小心添加至SPIN过滤器并以14,000g离心1分钟，且随后丢弃上清，并将500μl的SEWS-M添加至残留的沉淀并重悬。离心1分钟后，丢弃上清，并重复离心使得不会残留任何缓冲液。随后，将50μl DES(无DNA酶/热原的水)添加至残留的材料，随后以14,000g离心1分钟，且随后分离基因组DNA。

[0154] 使用Experion RNA(DNA) StdSens(Bio-Rad)芯片实施量化。如图16和17中所示的结果指示Luterial包含RNA和DNA。

[0155] (6) 16S rRNA测序

[0156] 16S rRNA(核糖体核糖核酸)是与多种蛋白相互作用以形成核糖体的DNA。由于16S rRNA核苷酸序列的变化速率显著低于基因组中大多数的其他基因的核苷酸序列的情况,可确认的是16S rRNA序列的相似性反映生物体之间的进化距离。

[0157] ①源自血液的Luterial

[0158] 使用FastDNA SPIN试剂盒(MP Biomedicals,目录号6560-200)处理实施例1中获得的Luterial以提取gDNA。使用提取的gDNA,使用PCR-premix(iNtRON Biotechnology,Korea)和SEQ ID NOs:1-23的引物扩增Luterial的16S rRNA。

[0159] 扩增的PCR产物使用BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction试剂盒(Applied Biosystems,USA)和自动化的DNA分析仪系统(PRISM 3730XL DNA analyzer,Applied Biosystems)测序。扩增的PCR产物共有1461个片段。其中,1407个片段显示与源自变形菌的基因的同源性,20个片段显示与源自酸杆菌的基因的同源性,且11个片段显示与源自放线菌的基因的同源性(表4)。

[0160] 使用SeqMan软件(DNASTAR)组合具有经分析的核苷酸序列的片段,由此获得16S rRNA的核苷酸序列。

[0161] 图24显示健康个体Luterial DNA的细菌同源性,如通过源自健康人血液(血液pH:7.2-7.4)的Luterial的16S rRNA测序所确定,且显示了对多种大小的Luterial实施的分析结果((a):100nm或更小;(b):100-200nm,(c)200-400nm和(d)400-800nm)。Luterial的大小间无显著性差异,且Luterial全部显示与源自变形菌、厚壁菌和拟杆菌的基因的同源性。

[0162] 图25(c)显示从具有疾病的患者获得的Luterial DNA的细菌同源性。使用了源自具有疲劳或疾病状况的患者的血液(血液pH:7.0或更低)的200-400nm Luterial的16S rRNA测序数据。与健康状况不同的是,从患者获得的Luterial基因显示与源自链型植物的基因的同源性。

[0163] 图26(a)、26(b)和26(c)显示了基于源自血液的Luterial的16S rRNA序列的进化树。

[0164] 表4

[0165]

分级	分类	名称	LKL-B	SUM (比率)	LKL-B	总数(数目)
门	细菌;;;变形菌	变形菌	96.3039	96.3039	1407	1407
门	细菌;;;酸杆菌	酸杆菌	1.36893	1.36893	20	20
门	细菌;;;放线菌	放线菌	0.75291	0.75291	11	11
门	细菌;;;拟杆菌	拟杆菌	0.54757	0.54757	8	8
门	细菌;;;蓝藻	蓝藻	0.41068	0.41068	6	6
门	真核生物; 植物界;; 链型植物	链型植物	0.27379	0.27379	4	4

[0166]

门	细菌;;; 厚壁菌	厚壁菌	0.20534	0.20534	3	3
门	细菌;;;TM6	TM6	0.06845	0.06845	1	1
门	细菌;;; 浮霉菌	浮霉菌	0.06845	0.06845	1	1

[0167] 已显示源自血液的Luterial的16S rRNA片段显示了与多种细菌的同源性，包括β-变形菌、γ-变形菌、拟杆菌、厚壁菌和链型植物。

[0168] 一般而言，当微生物分类的gDNA的相关性小于70％时，将微生物认作独立种系。此外，通过统计学分析证明了当16S rRNA序列的同源性小于97％时，gDNA的相关性小于70％。因此，分析了与Luterial的16S rRNA片段具有97％或更大同源性的细胞。如下文表5-7所示，源自血液的Luterial显示了与γ-变形菌100％的同源性、与厚壁菌97.53％的同源性和与拟杆菌97％或更高的同源性。

[0169] 同时，如表8所示，异常酸性Luterial显示与链型植物99％或更高的同源性。

[0170] 表5:通过16S rRNA Seq的Luterial的特征

[0171]

原始数据Seq名称	序列	Hit登录号	相似性	分类分配
IOFBYRO01DTJ3I	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGGACAACATTCCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTCCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;γ变形菌;;假单胞菌目(Pseudomonadales);;莫氏杆菌科(Moraxellaceae);;不动细菌属(Acinetobacter);琼氏不动杆菌(Acinetobacter junii);;LMG 998-AM410704(T)

[0172]

IOFBYRO01DUOG5	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;γ变形菌;;假单胞菌目;;莫氏杆菌科;;不动细菌属;琼氏不动杆菌;;LMG 998-AM410704(T)
IOFBYRO01BHYT4	TTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGGGAATGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGACCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCGGCGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;γ变形菌;;假单胞菌目;;莫氏杆菌科;;不动细菌属;琼氏不动杆菌;;LMG 998-AM410704(T)
IOFBYRO01CYAL1	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGCACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;γ变形菌;假单胞菌目;;莫氏杆菌科;;不动细菌属;琼氏

[0173]

	TAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG GGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGG GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGGAACCCCTGATCCAGCC ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATG GTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAG GCTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTG GACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCT AACTCTGTG			不动杆菌;;;LMG 998-AM410704(T)
IOFBYRO01DRDH1	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACA TGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG CACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAG TAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAACA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG GGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGG GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCA TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGG TTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG CTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGG ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;**γ变形菌**;;假单胞菌目;;莫氏杆菌科;;不动细菌属;琼氏不动杆菌;;LMG 998-AM410704(T)
IOFBYRO01BWKSQ	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACA TGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG CACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAG TAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;;**γ变形菌**;;假单胞菌目;;莫氏杆菌科;;不动细菌属;琼氏不动杆菌;;LMG 998-AM410704(T)

[0174]

	GGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGG GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCA TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGG TTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG CTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGG ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTG			
IOFBYRO01BWKSO	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACA TGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG CACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAG TAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGACAACATTCCGAAAGGAATGCTAATA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG GGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATG AGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGG GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGGAACCCTGATCCAGCCA TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGG TTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG CTACTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGG ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTG	AM410704	100	细菌;;;变形菌;; γ变形菌;; 假单胞菌目;; 莫氏杆菌科;; 不动细菌属;琼氏不动杆菌;; ;LMG 998-AM410704(T)
IOFBYRO01A8KAW	TATTAGTGGGGGACAACATTCCGAAAGG AATGCTAATCCGCATACGTCCTACGGGA GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGC TAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCT AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC GACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATG ATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG GGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTG	AKIQ01000085	100	细菌;;;变形菌;; γ变形菌;; 假单胞菌目;; 莫氏杆菌科;; 不动细菌属;Acinetobacter venetianus;;RAG-1-AKIQ01000085(T)

[0175]

	ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG GCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGA GGAGGACGCTACTAGTATTAATACTACTG GATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGC ACCGGCTAACTCTGTG			

[0176] 表6:厚壁菌

原始数据Seq名称	序列	Hit登录号	相似性	分类分配
IOFBYRO01ANZSO	GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGA ACGCTGAAGCTTGGTGCTTGCACCGAGC GGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGC GTAGGTAACCTGCCTCTTACCGGGGCAT AACTATTGGAAACGATAGCTAATACAGCA TAAAAGTCGATATCGCATGATATTGATTT GAAAGGTGCAATTGCATCACTAAGAGAT GGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATAC ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GGCAATGGGGGCAACCCTGACCGAGCA ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG GATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAA CGAGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTG TGACGGTAACTTACCAGAAAGGGACGGC TAACTACGTG	ADVN01000004	97.53	细菌;;;**厚壁菌**;;细菌(Bacilli);;乳杆菌目(Lactobacillales);;链球菌科(Streptococcaceae);;链球菌属(Streptococcus);Streptococcus parasanguinis;;ATCC 15912-ADVN01000004(T)

[0177]

[0178] 表7:拟杆菌

原始数据Seq名称	序列	Hit登录号	相似性	分类分配
IOFBYRO01BUV34	TGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATG CAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCAA TATTTGGGTGGCGACCGGCAAACGGGTG CGGAACACGTACACAACCTTCCGATAAG TGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATT AATACCCCGTAACATATAGAGATGGCATC GTCTTTATATTATAGCTTCGGTGCTTATT GATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTAGTTG GCGGGGTAACGGCCCACCAAGCCTACG ATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATCA	4P004046	99.79	细菌;;;**拟杆菌**;;Sphingobacteria;;Sphingobacteriales;;Chitinophagaceae;;4P004046_g;4P004046_s;;4P004046

[0179]

[0180]

	GCCACACGGGCACTGAGACACGGGCCC GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATGCCGCGTGAAGGATGAATGTCC TCTGGATTGTAAACTTCTTTTATTTGGGA CGAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTGACG GTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTAACT CCGTG			
IOFBYRO01AEZDS	GATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACA TGCAAGTCGAGGGGCAGCACATGAAGTA GCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCA CGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACC TTCAACAGGAGAATAACCCGTCGAAAGA CGGACTAATACTCCATAACACAGGGATC CCACATGGGAATATTTGTTAAAGATTTAT CGGTTGAAGATGGGCATGCGCTCCATTA GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA GGCAACGATGGATAGGGGAACTGAGAG GTTTATCCCCCACACTGGTACTGAGACA CGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAAC TCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGAT GACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTTT GTAAGGGAATAAAGTTAGTTACGTGTAAC TATTTGCATGTACCTTACGAATAAGGATC GGCTAACTCCGTG	FJ672469	97.34	细菌;;; **拟杆菌**;;Bacteroidia;;Bacteroidales;;紫单胞菌科(Porphyromonadaceae);;AB243818_g;FJ672469_s;;FJ672469
IOFBYRO01BP52Z	GATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACA TGCAAGTCGAGGGGCAGCACATGAAGTA GCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCA CGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACC TTCAACAGGAGAATAACCCCTCGAAAGA CGGACTAATACTCCATAACACAGGGATC CCACATGGGAATATTTGTTAAAGATTTAT CGGTTGAAGATGGGCATGCGCTCCATTA GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA GGCAACGATGGATAGGGGAACTGAGAG GTTTATCCCCCACACTGGTACTGAGACA CGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA GTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAAC	FJ672469	97.34	细菌;;; **拟杆菌**;;Bacteroidia;;Bacteroidales;;紫单胞菌科;;AB243818_g;FJ672469_s;;FJ672469

[0181]

	TCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGAT GACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTTT GTAAGGGAATAAAGTTAGTTACGTGTAAC TATTTGCATGTACCTTACGAATAAGGATC GGCTAACTCCGTG			
IOFBYRO01BBMIP	TGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATG CAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCAA TATTTGGGTGGCGACCGGCAAACGGGTG CGGAACACGTACACAACCTTCCGATAAG TGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATT AATACCCCGTAACATATAGAGATGGCATC GTCTTTATATTATAGCTTCGGTGCTTATT GATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTAGTTG GCGGGGTAACGGCCCACCAAGCCTACG ATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATCA GCCACACGGGCACTGAGACACGGGCCC GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATGCCGCGTGAAGGATGAATGTCC TCTGGATTGTAAACTTCTTTTATTTGGGA CGAAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTGAC GGTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTAAC TCCGTG	4P004046	99.79	细菌;;;拟杆菌;;Sphingobacteria;;Sphingobacteriales;;Chitinophagaceae;;4P004046_g;4P004046_s;;4P004046
IOFBYRO01BBHTW	ATGGACGCTAGCGGCAGGCTTAATACAT GCAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCA ATATTGCGTGCGCGACCGGCAAACGGGT GCGGAACACGTACACAACCTTCCGATAA GTGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGAT TAATACCCCGTAACATATAGAGATGGCAT CGTCTTTATATTATAGCTTCGGCGCTTAT TGATGGGTGTGCGTCTAATTAGGTAGTT GGCGGGGTAACGGCCCACCAAGCCTAC GATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATC AGCCACACGGGCACTGAGACACGGGCC CGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGG AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT CCAGCCATGCCGCGTGAAGGATGAATGT CCTCTGGATTGTAAACTTCTTTTATTTGG GACGAAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTG	4P004046	99.58	细菌;;;拟杆菌;;Sphingobacteria;;Sphingobacteriales;;Chitinophagaceae;;4P004046_g;4P004046_s;;4P004046

[0182]

	ACGGTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTA ACTCCGTG			
IOFBYRO01BQCEI	GATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACA TGCAAGTCGAAGGGGCAGCACATGAAGT AGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCA CGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACC TTCAACAGGAGAATAACCCGTCGAAAGA CGGACTAATACTCCATAACACAGGGATC CCACATGGGAATATTTGTTAAAGAGTTTA TCGGTTGAAGATGGGCATGCGCTCCATT AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA AGGCAACGATGGATAGGGGAACTGAGA GGTTTATCCCCCACACTGGTACTGAGAC ACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAA CTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGA TGACGGCCCTACGGGTTGTAAACTTCTTT TGTAAGGGAATAAAGTTAGTTACGTGTAA CTATTTGCATGTACCTTACGAATAAGGAT CGGCTAACTCCGTG	FJ672469	97.34	细菌;;;**拟杆菌**;;Bacteroidia;;Bacteroidales;;紫单胞菌科;;AB243818_g;FJ672469_s;;FJ672469
IOFBYRO01CGIIX	ATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACAT GCAAGTCGAGGGGCAGCACGGTATAGC AATATATGGGTGGCGACCGGCAAACGGG TGCGGAACACGTACACAACCTTCCGGTC AGCGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGA TTAATACCCCATACTATAATGATCAGGCA TCTGGTTATTATCAAAGGCTTCGGCCGCT TATTGATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTA GTTGGCGGGGTAGAGGCCCACCAAGCC TACGATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATG ATCAGCCACACGGGCACTGAGACACGGG CCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAA GGAATATTGGACAATGGACGCAAGTCTG ATCCAGCCATGCTGCGTGAAGGATGAAT GCCCTCTGGGTTGTAAACTTCTTTTACAG GGGAAGAAAGTTATCTTTTTTAGGATATT TGACGGTACCCTATGAATAAGCACCGGC TAACTCCGTG	FN665659	97.8	细菌;;;**拟杆菌**;;Sphingobacteria;;Sphingobacteriales;;Chitinophagaceae;;Hydrotalea;Hydrotalea flava;;CCUG 51397-FN665659(T)

[0183]

IOFBYRO01BUV35	TGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATG CAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCAA TATTTGGGTGGCGACCGGCAAACGGGTG CGGAACACGTACACAACCTTCCGATAAG TGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATT AATACCCCGTAACATATAGAGATGGCATC GTCTTTATATTATAGCTTCGGTGCTTATT GATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTAGTTG GCGGGGTAACGGCCCACCAAGCCTACG ATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATCA GCCACACGGGCACTGAGACACGGGCCC GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATGCCGCGTGAAGGATGAATGTCC TCTGGATTGTAAACTTCTTTTATTTGGGA CGAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTGACG GTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTAACT CCGTG	4P004047	99.24906689	细菌;;;**拟杆菌**;;Sphingobacteria;;Sphingobacteriales;;Chitinophagaceae;;4P004046_g;4P004046_s;;4P004047

[0184] 表8:链型植物

[0185]

原始数据Seq名称	**序列**	**Hit 登录号**	**相似性**	**分类分配**
IOFBYRO01BVMU5	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTTCC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCGTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACTTCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAACCATCCGCTAACTCTGTG	CAAP02016081	100	真核(Eukarya);绿色植物(Viridiplantae);;**链型植物**;;eudicotyledons;;core eudicotyledons;;葡萄科(Vitaceae);;葡萄属(Vitis);Vitis vinifera;;CAAP02016081
IOFBYRO01DG9Y3	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTTCC	CAAP02016081	100	真核;绿色植物;;**链型植物**;;eudicotyledons;

[0186]

	AGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCGTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACTTCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG			;core eudicotyledons;; 葡萄科;;葡萄属;Vitis vinifera;;CAAP02016081
IOFBYRO01BVXH2	GATGAACGCTGCCCGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTTCC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCGTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACTTCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG	CAAP02016081	100	真核; 绿色植物;;链型植物;;eudicotyledons;;core eudicotyledons;; 葡萄科;;葡萄属;Vitis vinifera;;CAAP02016081
IOFBYRO01CVD3E	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTTCC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGGGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA	CAAP02016081	99.77	真核; 绿色植物;;链型植物;;eudicotyledons;;core eudicotyledons;; 葡萄科;;葡萄属;Vitis vinifera;;CAAP02016081

[0187]

	TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCGTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACTTCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG			

[0188] (2)源自精液的Luterial

[0189] 根据上文所述的方法将实施例2中获得的源自精液的Luterial用于gDNA的提取、PCR扩增和测序。图25显示Luterial DNA的细菌同源性，如通过源自正常状况和疲劳或疾病状况(精液pH:7.0或更低)的患者的精液的Luterial的16S rRNA测序确定的。分析用多种大小的Luterial实施((a):100nm或更小，(b):100-200nm和(d)400-800nm)。

[0190] 正常的源自精液的Luterial显示了与源自变形菌、厚壁菌和拟杆菌的基因的同源性，如源自血液的Luterial般。具体地，Luterial显示与源自脊索动物的基因的同源性。

[0191] 源自精液的Luterial的DNA在异常酸性条件下显示与源自链型植物的基因的同源性。

[0192] (7)ATP含量的测量

[0193] 将包括对照、Luterial、Luterial及SSH(12小时)和Luterial及SSF(12小时)的四种介质每种10mL置于管中，并向其添加葡萄糖(100mg/mL)和ADP底物(1mM)，随后在37℃的水浴中培养。开始培养后的30分钟间隔，收集100μl样品，置于管中，并用900μl蒸馏水稀释10倍。随后，将10μl的样品转移至新鲜的管中，并向其添加100μl包含在ATP试剂盒中的荧光素酶试剂，且使用光度计立即实施5次测量。

[0194] 如图18所示，相比无Luterial的对照介质，包含Luterial的介质显示了ATP浓度的增加。这些结果表明Luterial具有产生ATP的能力。在比较SSH和SSF介质间的结果中，SSF添加组中的ATP浓度高于SSH添加组(图18)。

[0195] 实施例4:Luterial的培养

[0196] (1)实施例1中获得的Luterial中，添加PBS后用IR光照射具有约50-200nm大小的Luterial，且随后在18-30℃培养约3小时。在用IR光照射后立即约1小时的间隔，用显微镜测量Luterial的大小。约1-6小时后，培养前具有约200nm大小的Luterial生长至约500nm的大小。因此，将水添加至源自血液的Luterial(其随后在用IR光照射下于18-30℃培养)时，Luterial可生长至约500nm的大小。一致地，当额外培养Luterial时，其生长至数百μm的大小且还在额外培养的过程中破裂(图22)。

[0197] (2)在实施例1中获得的Luterial中，添加PBS后用IR光照射具有约400-800nm的大小的Luterial，且随后在18-30℃培养约3小时。在用IR光照射后立即1小时的间隔，Luterial的大小和状态用显微镜测量。约1-6小时后，显示了培养前具有约400-800nm大小的Luterial经历分裂而不生长。

[0198] 此外，观察到当进一步培养具有800nm或更大尺寸的突变体Luterial时，其变为在癌症患者血液中所见的突变体Luterial(图23)。

[0199] 实施例5:Luterial的抗癌效果

[0200] 为了测量Luterial对两种卵巢细胞系(SKOV3和A2780)生长的抑制效果,实施了四唑黄MTT(3-(4,5-二甲基噻唑基-2)-2,5-二苯基四唑溴化物)测定法。MTT测定法是用于测量活细胞生长的方法,且基于当添加黄色水溶物质MTT时活细胞线粒体中的脱氢酶产生紫色甲臜(formazan)的原理。已知紫色甲臜的产生与具有代谢活性的活细胞数目基本成比例,且因此在测量细胞的生长和分化中十分有效。

[0201] 具体地,将100μl培养的癌细胞以5x10^{4}细胞/ml的浓度添加至96孔板并在加湿培养箱(5%碳和95%氧)中于37℃培养24小时,且随后用具有100-800nm大小的多种浓度的Luterial处理。培养48小时后,将15μl在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的MTT溶液(5mg/ml)添加至每孔,随后培养4小时。确认甲臜形成后,完全去除介质,并将100μl的二甲基亚砜(DMSO)添加至每孔以溶解在孔底形成的甲臜。此后,使用酶标仪(GEMINI,Stratec Biomedical)测量在560nm处的吸收,且计算了通过Luterial相对于100%的对照细胞的细胞生长抑制率。

[0202] 结果,SKOV3和A2780细胞系的Luterial的IC_{50}值分别为30μg/ml和60μg/ml。商业可获的抗癌药顺铂的IC_{50}值为100μM(图27)。对于两种卵巢癌细胞系,Luterial显示了比阳性对照药更强的细胞毒性,且对于正常卵巢细胞显示了与阳性对照药物相似的细胞毒性。

[0203] 工业实用性

[0204] 如上文所述,根据本发明,可有效分离患者或正常人的体液中存在的未鉴定的纳米大小的颗粒Luterial,且可培养分离的Luterial从而生长至一定大小。如此,Luterial可用于疾病的诊断和治疗。此外,Luterial显示针对癌细胞系的强抗癌效果,且因此可用作抗癌剂。

[0205] 尽管本发明已参照具体特征详细描述,对本领域的技术人员显而易见的是本说明书仅用于优选的实施方案且不限制本发明的保护范围。因此,本发明的实质范围会通过所附的权利要求及其等同物限定。

<110> 崔元哲(CHOI, Won Cheol)
权宁娥(KWON, Young Ah)
崔硕训(CHOI, Suk Hoon)
崔彰训(CHOI, Chang Hoon)

<120> Luterial 和用于其分离及培养的方法

<130> PF-B1729

<140> PCT/KR2014/004197
<141> 2014-05-09

<150> 10-2014-0004525
<151> 2014-01-14

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16S-F

<400> 1
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag acgagtttga tcmtggctca g 51

[0001]

<210> 2
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, Bif16S-F

<400> 2
cctatcccct gtgtgccttg gcagtctcag acgggttcga ttctggctca g 51

<210> 3
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-7-4

<400> 3
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agagctgacw ttaccgcggc tgctgg 56

<210> 4
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-7-7

<400> 4
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag tcagatgacw ttaccgcggc tgctgg 56

<210> 5
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16 7 8

<400> 5
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag cgatgagacw ttaccgcggc tgctgg 56

<210> 6
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16 7 12

<400> 6
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag tctgcagacw ttaccgcggc tgctgg 56

<210> 7
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-7-13

<400> 7
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agcgatgacw ttaccgcggc tgctgg 56

[0002]

<210> 8
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-8-3

<400> 8
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atgctgagac wttaccgcgg ctgctgg 57

<210> 9
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-8-4

<400> 9
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag tacagcagac wttaccgcgg ctgctgg 57

<210> 10
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-8-18

<400> 10

ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atcgtgtgac wttaccgcgg ctgctgg 57

<210> 11
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-8-21

<400> 11
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag ctacacagac wttaccgcgg ctgctgg 57

<210> 12
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-9-4

<400> 12
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag cgtgtactga cwttaccgcg gctgctgg 58

<210> 13
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-9-5

[0003]

<400> 13
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag ctgtctacga cwttaccgcg gctgctgg 58

<210> 14
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-9-8

<400> 14
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agtcactaga cwttaccgcg gctgctgg 58

<210> 15
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-9-12

<400> 15
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agctcactga cwttaccgcg gctgctgg 58

<210> 16
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工

<220>

<223> 引物, B16-10-6

<400> 16
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atcacgtgcg acwttaccgc ggctgctgg 59

<210> 17
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-10-7

<400> 17
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag atagctctcg acwttaccgc ggctgctgg 59

<210> 18
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-10-8

<400> 18
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agtgagctcg acwttaccgc ggctgctgg 59

<210> 19
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工

[0004]

<220>
<223> 引物, B16-10-9

<400> 19
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag agtctgactg acwttaccgc ggctgctgg 59

<210> 20
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-11-1

<400> 20
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag tcatatacgc gacwttaccg cggctgctgg 60

<210> 21
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-11-2

<400> 21
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag tagatagtgc gacwttaccg cggctgctgg 60

<210> 22
<211> 60
<212> DNA

<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-11-3

<400> 22
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag acgtctctac gacwttaccg cggctgctgg 60

[0005] <210> 23
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物, B16-11-4

<400> 23
ccatctcatc cctgcgtgtc tccgactcag ctagagacac tacwttaccg cggctgctgg 60



图1

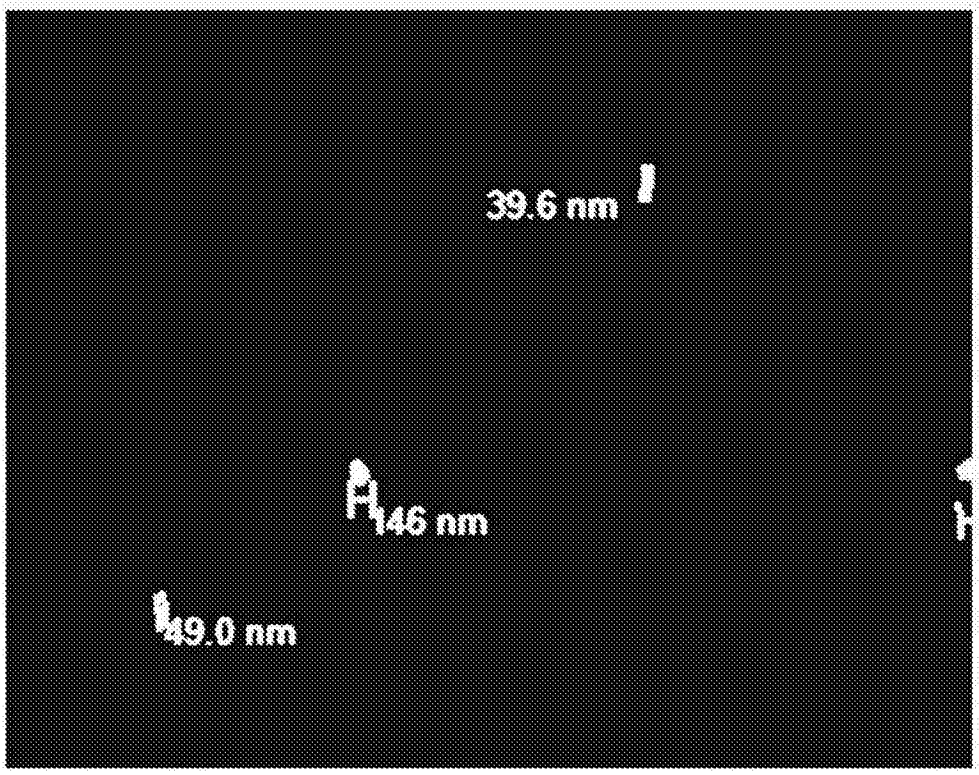


图2a

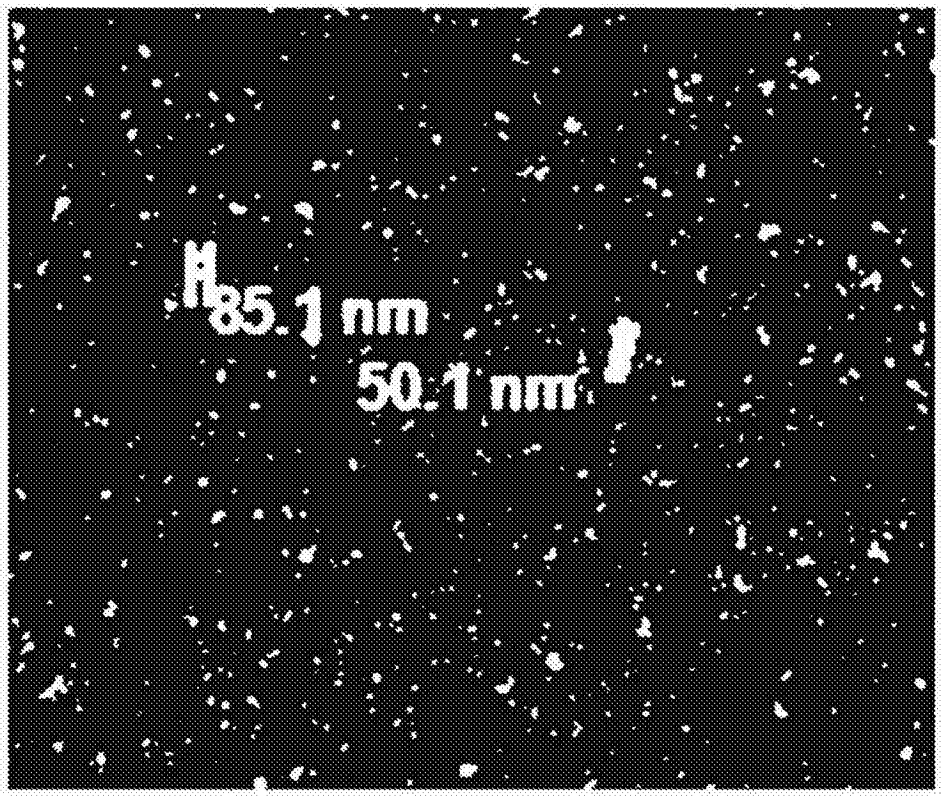


图2b

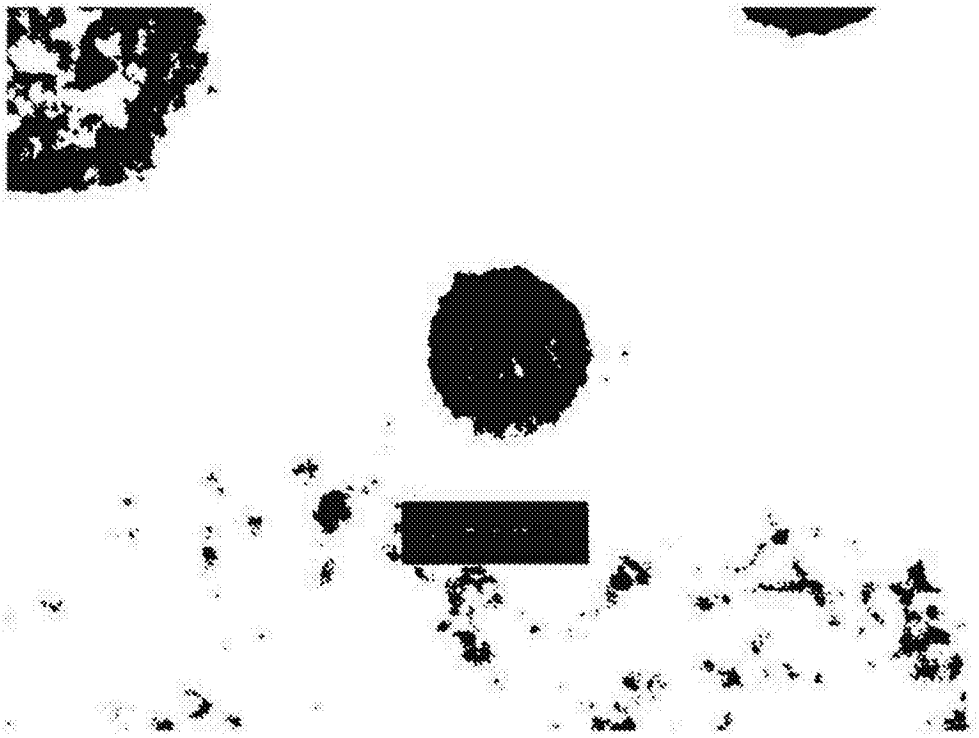


图2c

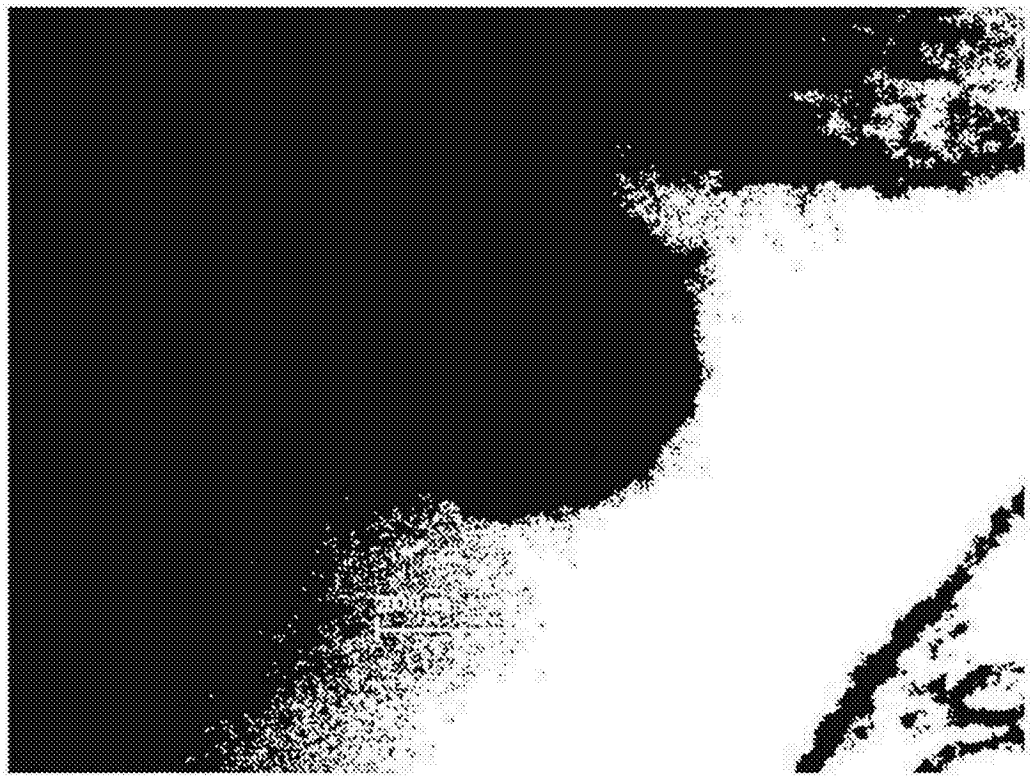


图2d

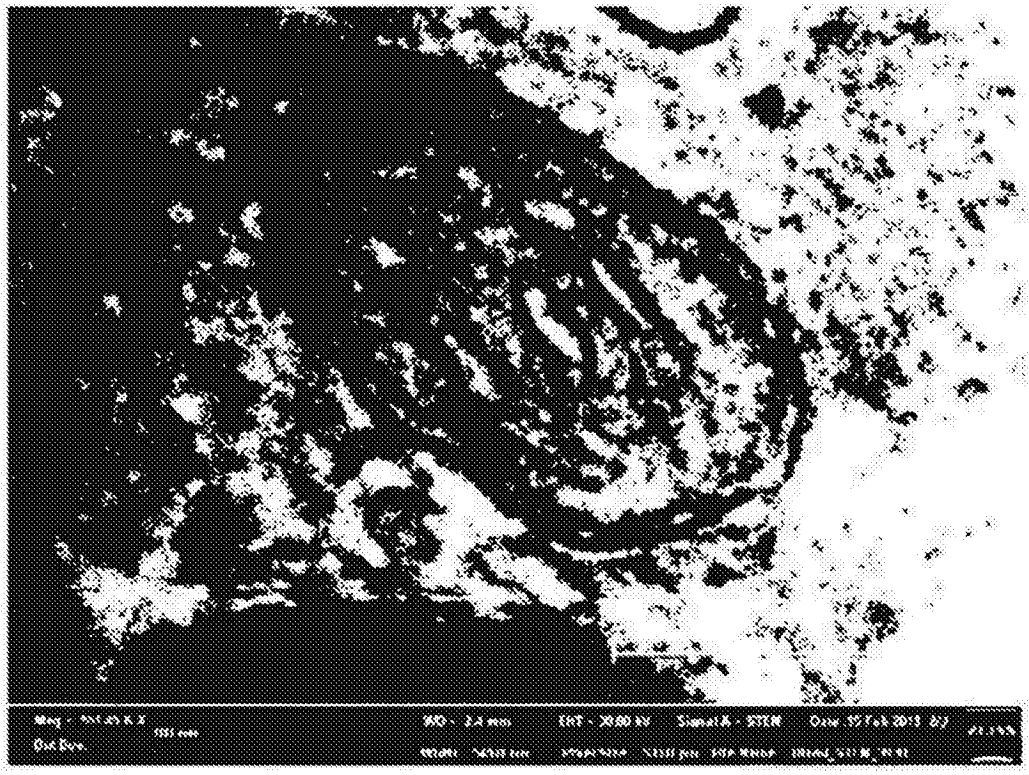


图2e

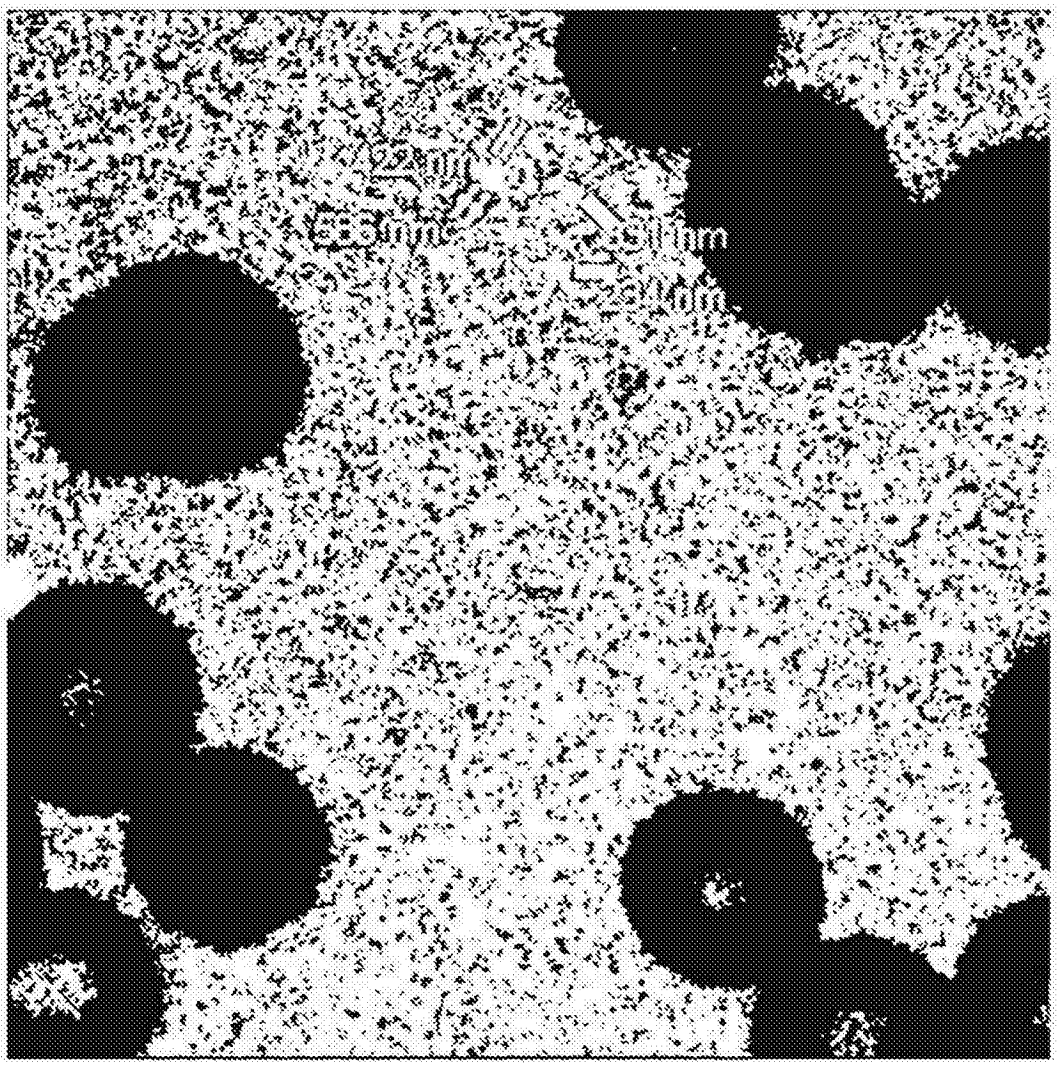


图2f

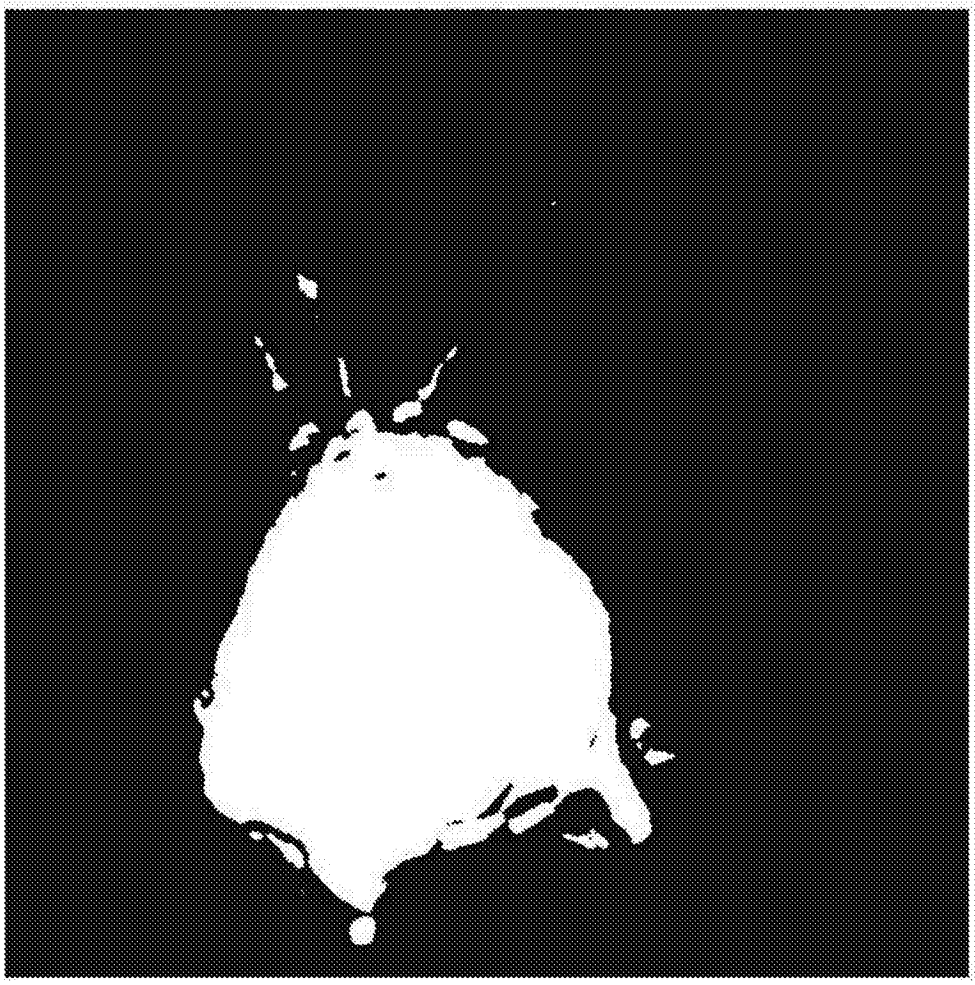


图2g

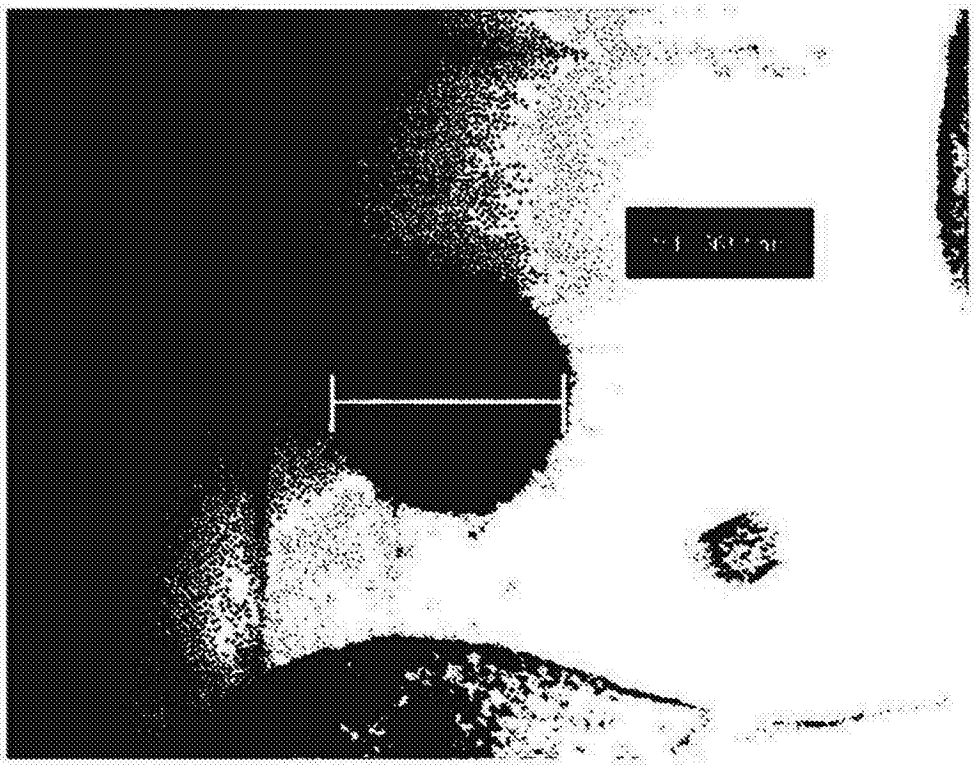


图2h

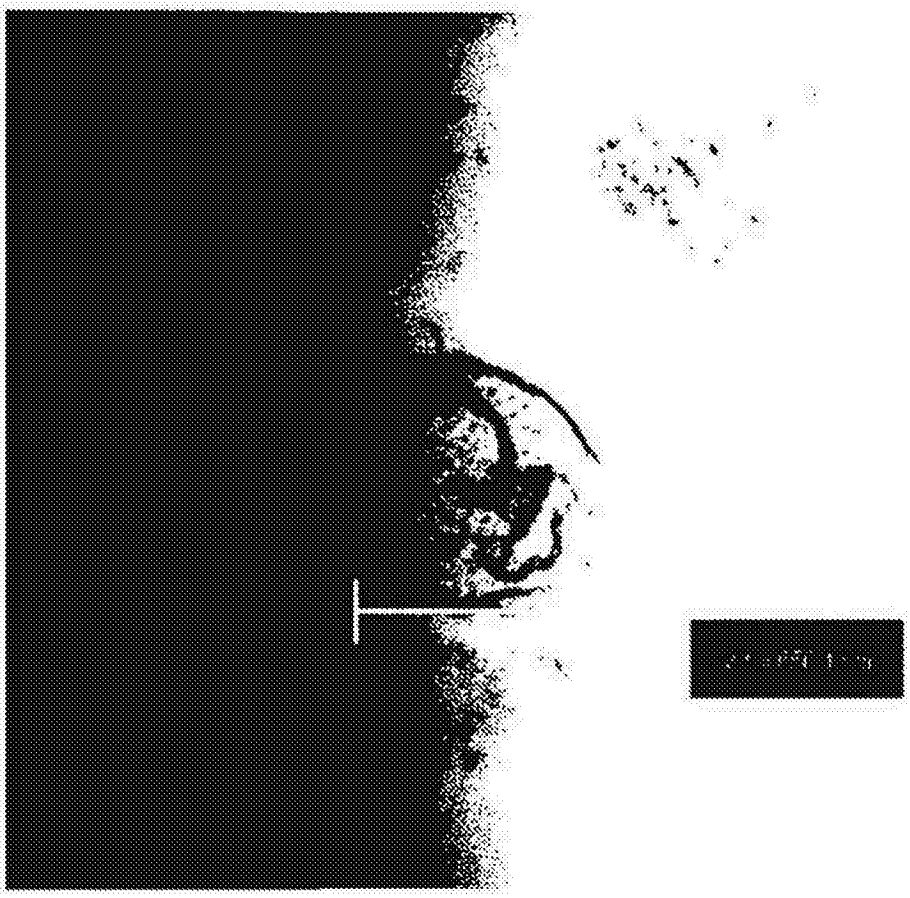


图2i

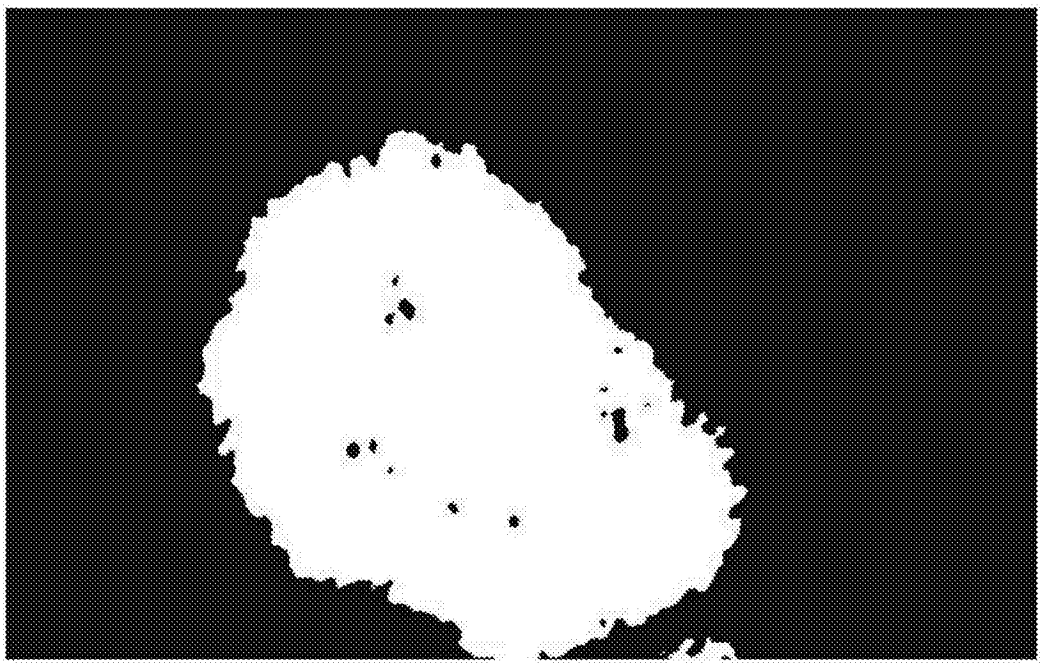


图2j

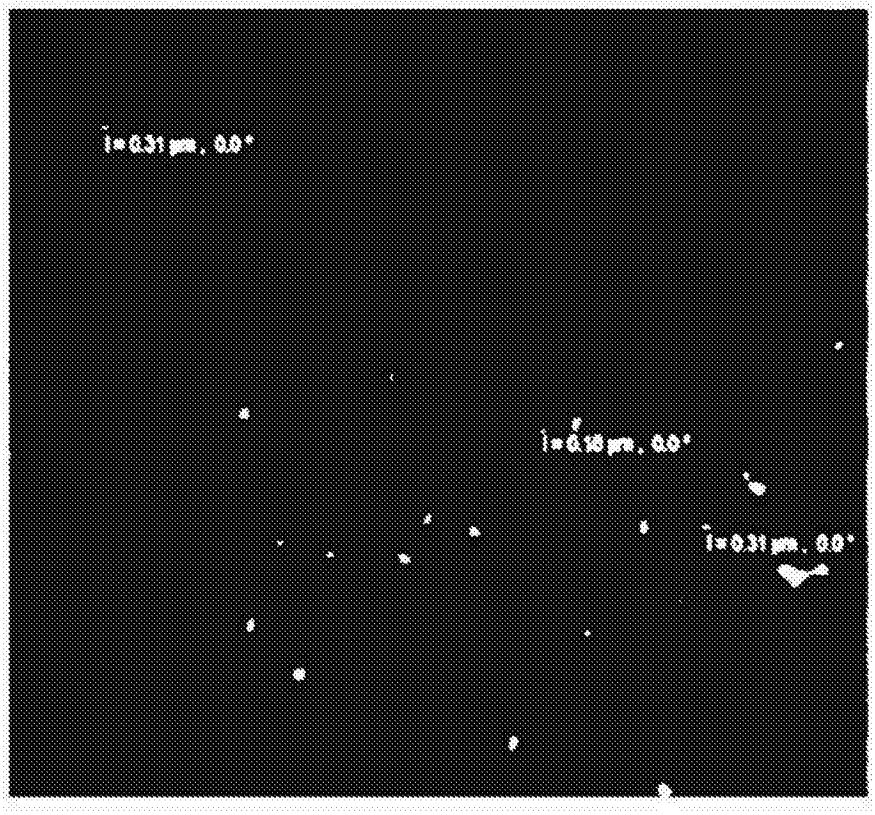
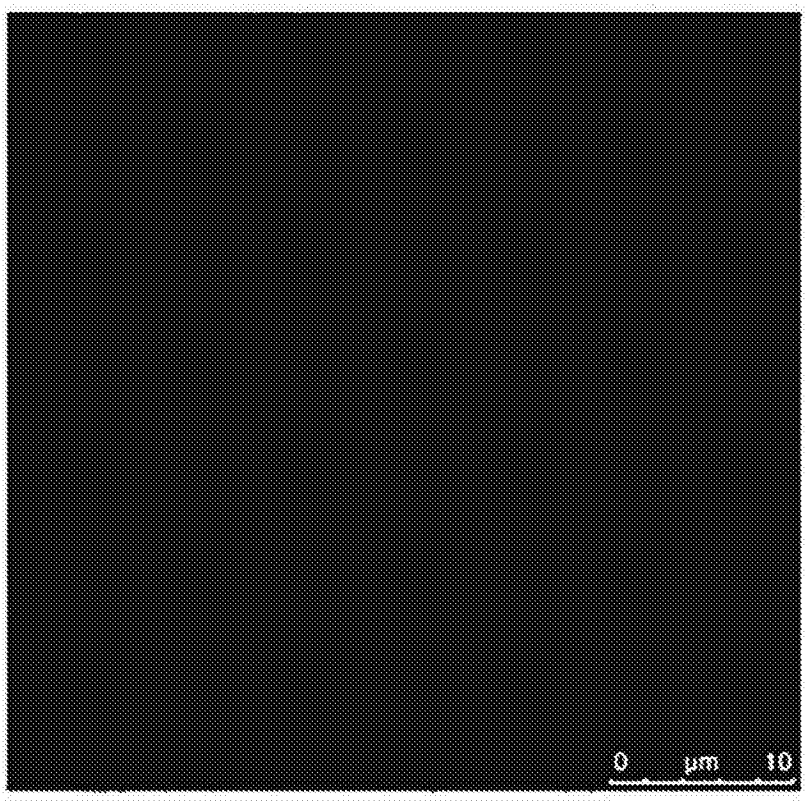


图3



实时录制(CCD)Mito-tracker阳性

图4

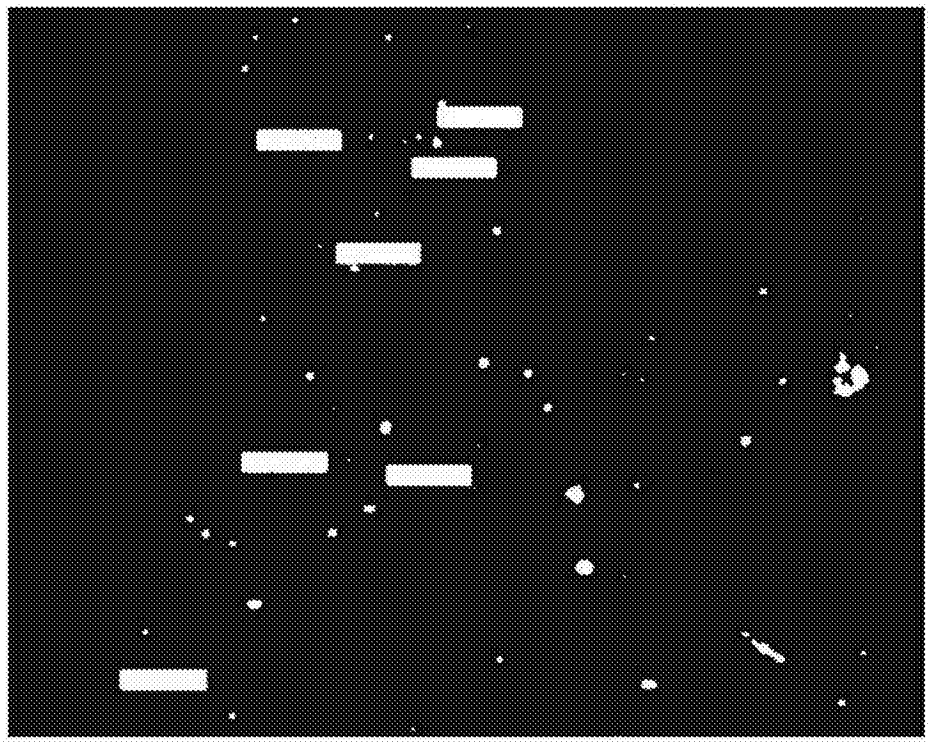


图5



图6

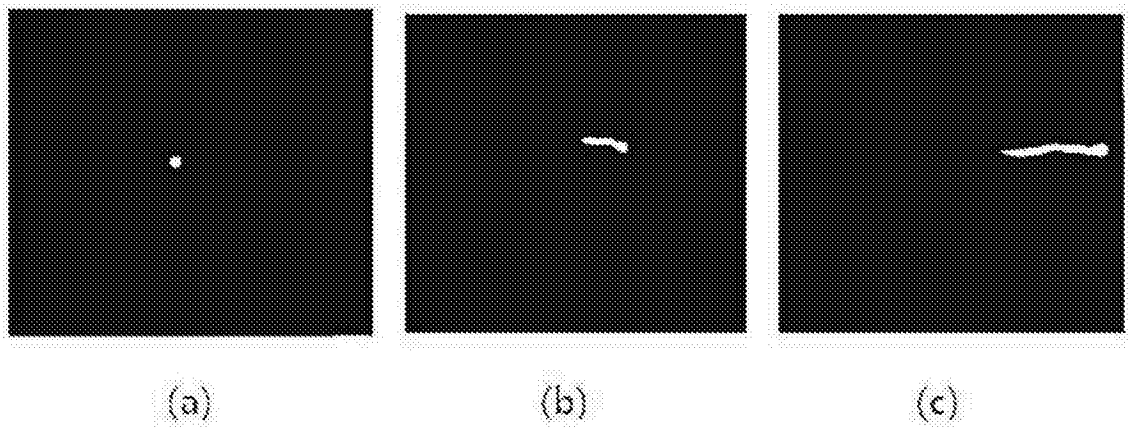


图7

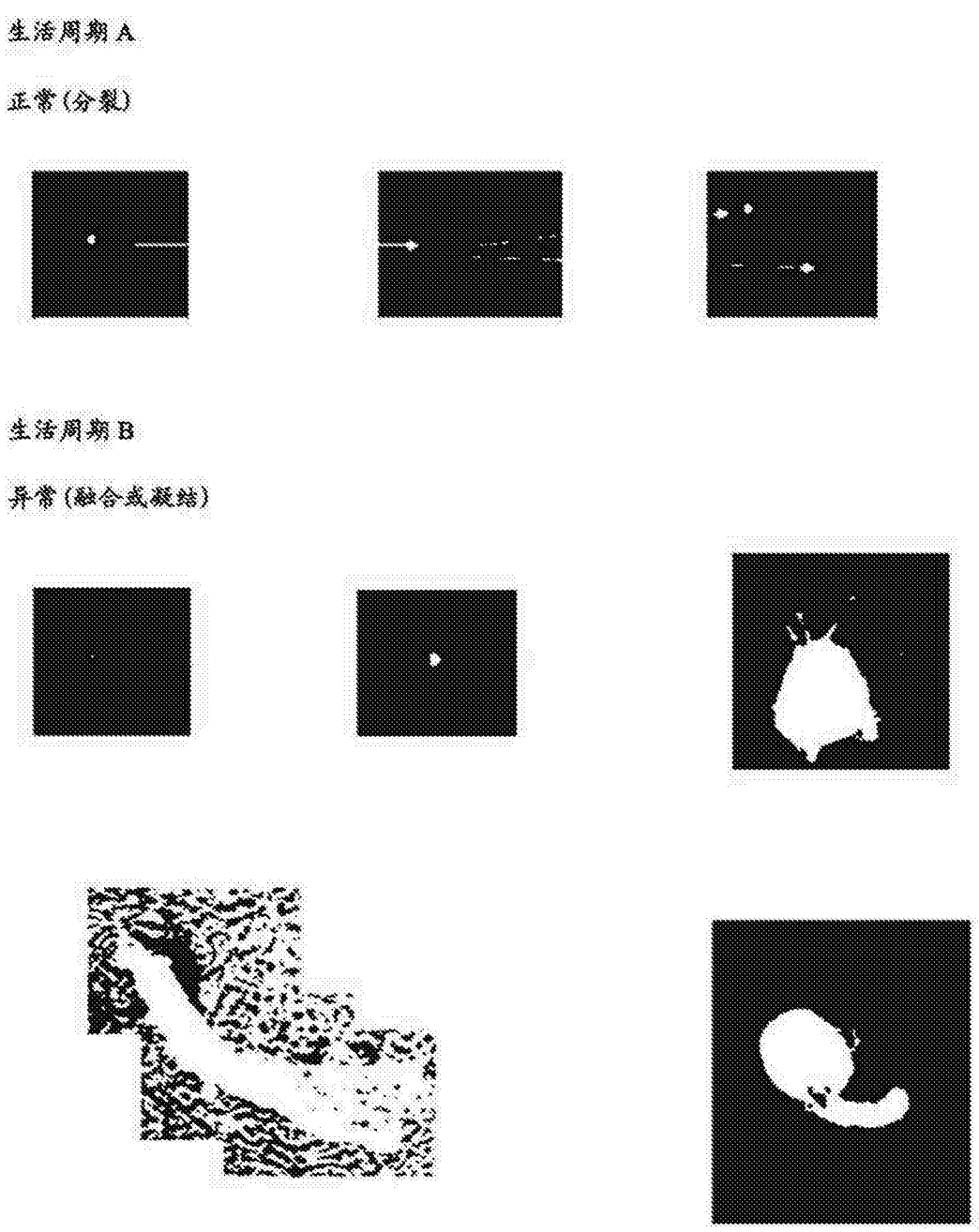


图8

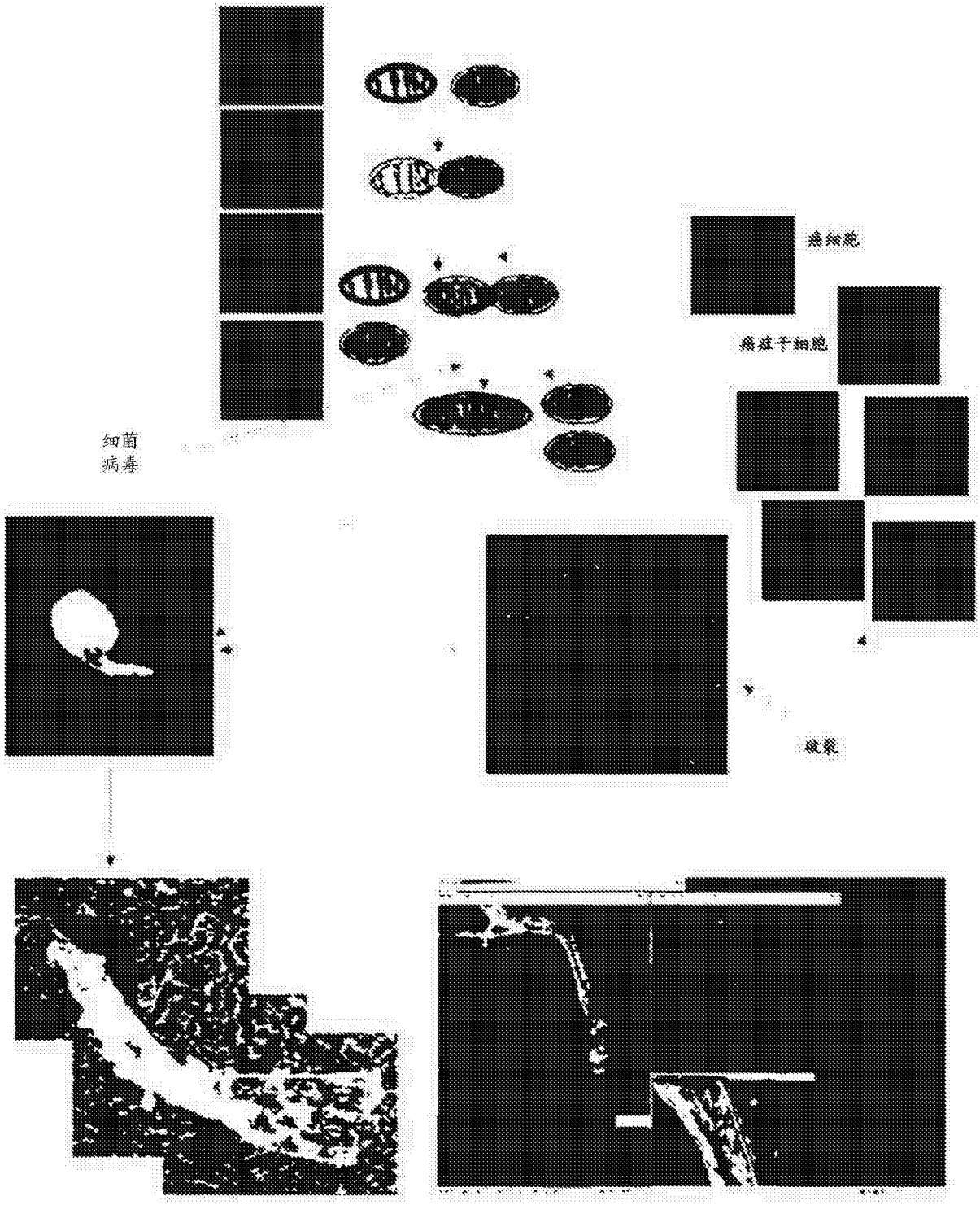


图9

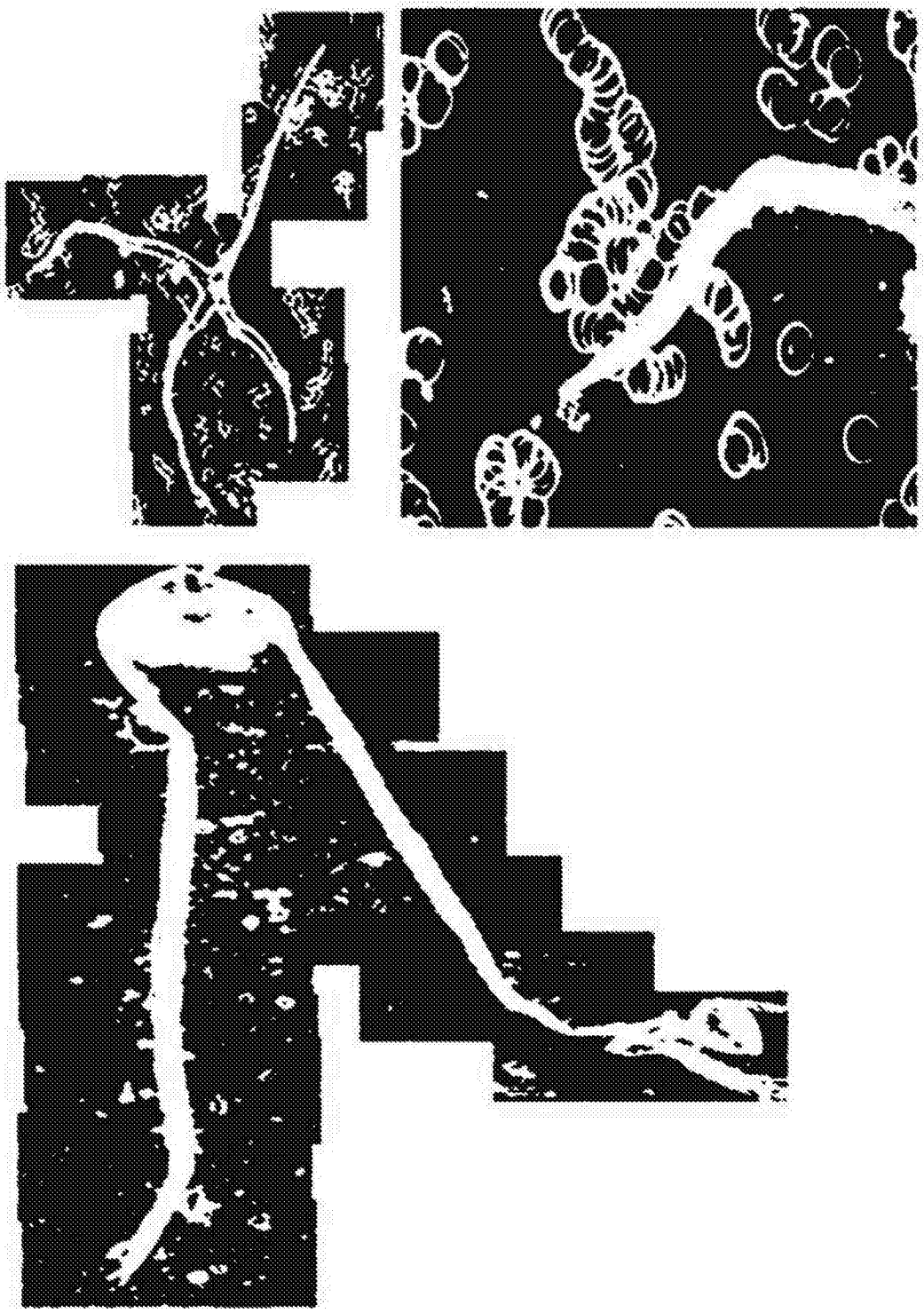


图10a

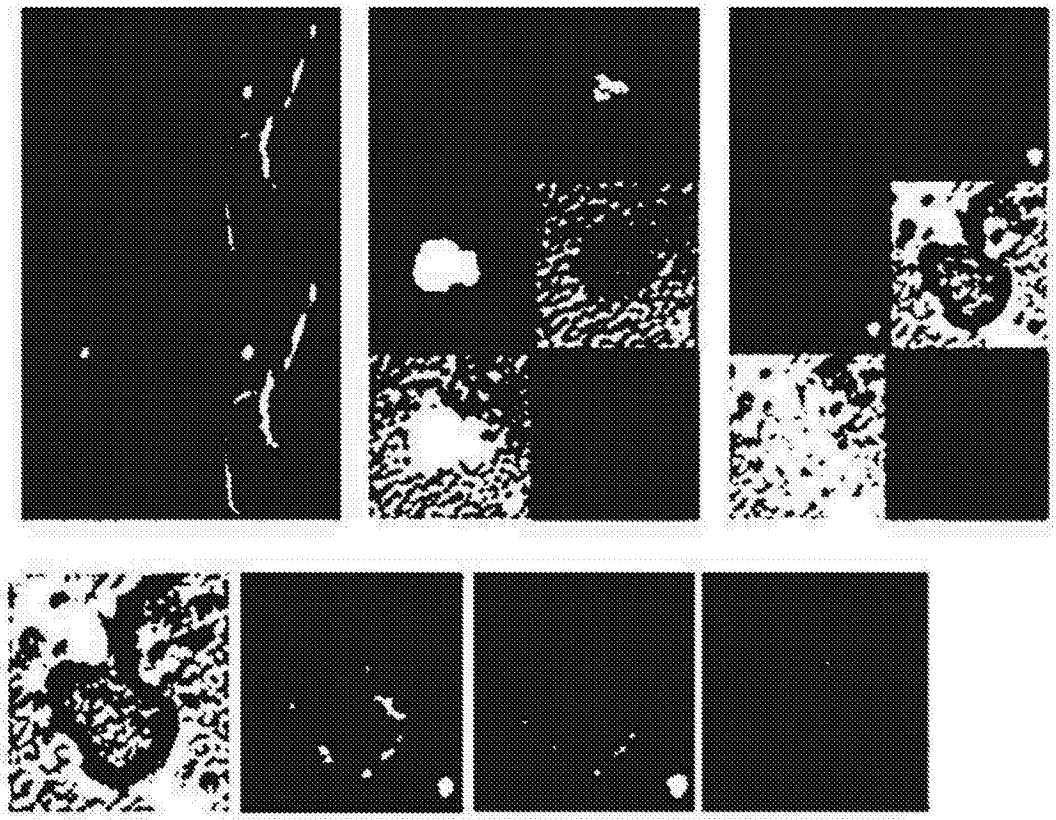


图10b


LUTERION™和LUTERIAL™生命周期的感知
细胞外的RNAi
20~200nm RNAi
LUTERIAL
细胞外
细胞

图11



图12

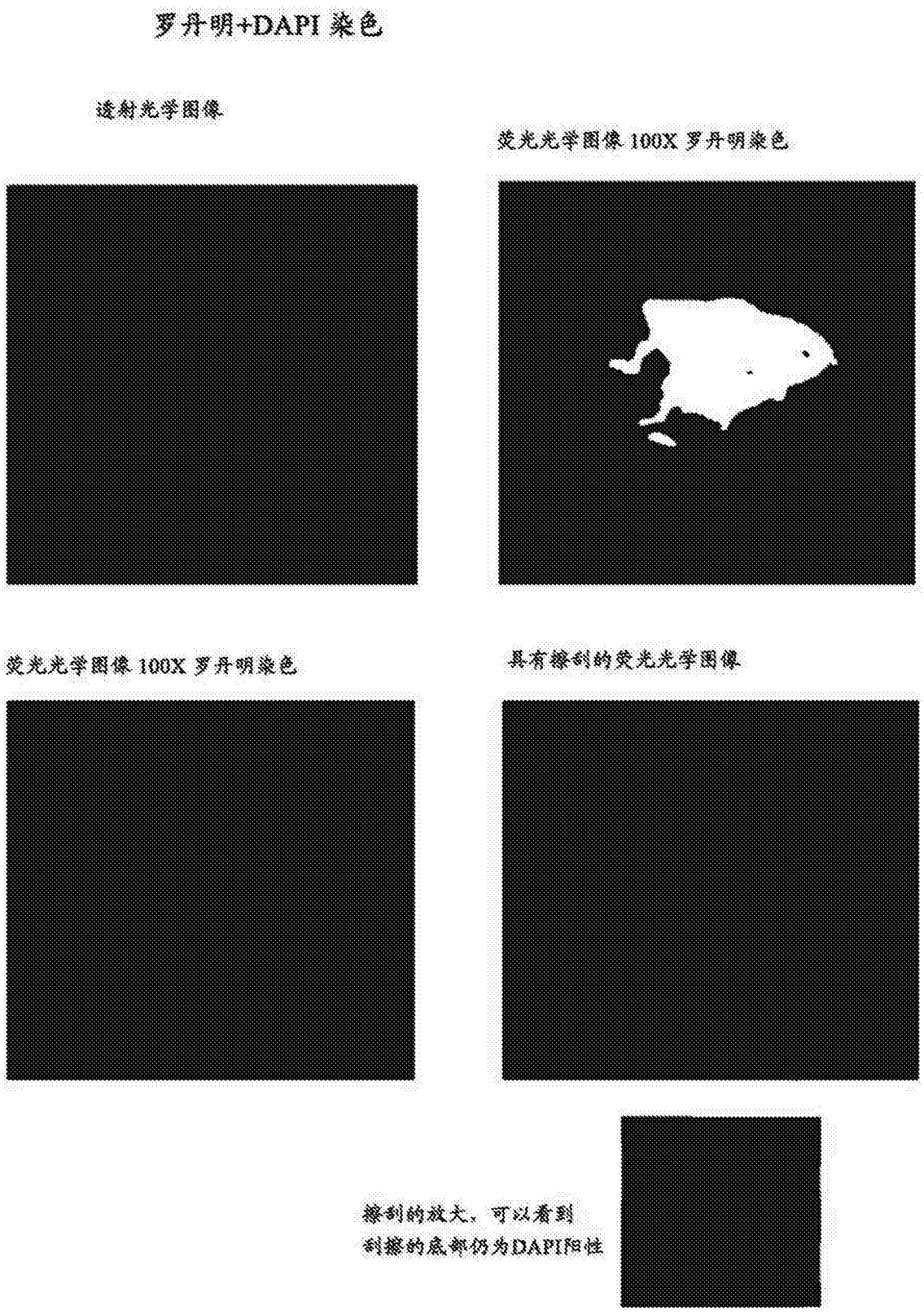

罗丹明+DAPI 染色
透射光学图像
荧光光学图像 100X 罗丹明染色
荧光光学图像 100X 罗丹明染色
具有擦刮的荧光光学图像
擦刮的放大，可以看到
刮擦的底部仍为DAPI阳性

图13

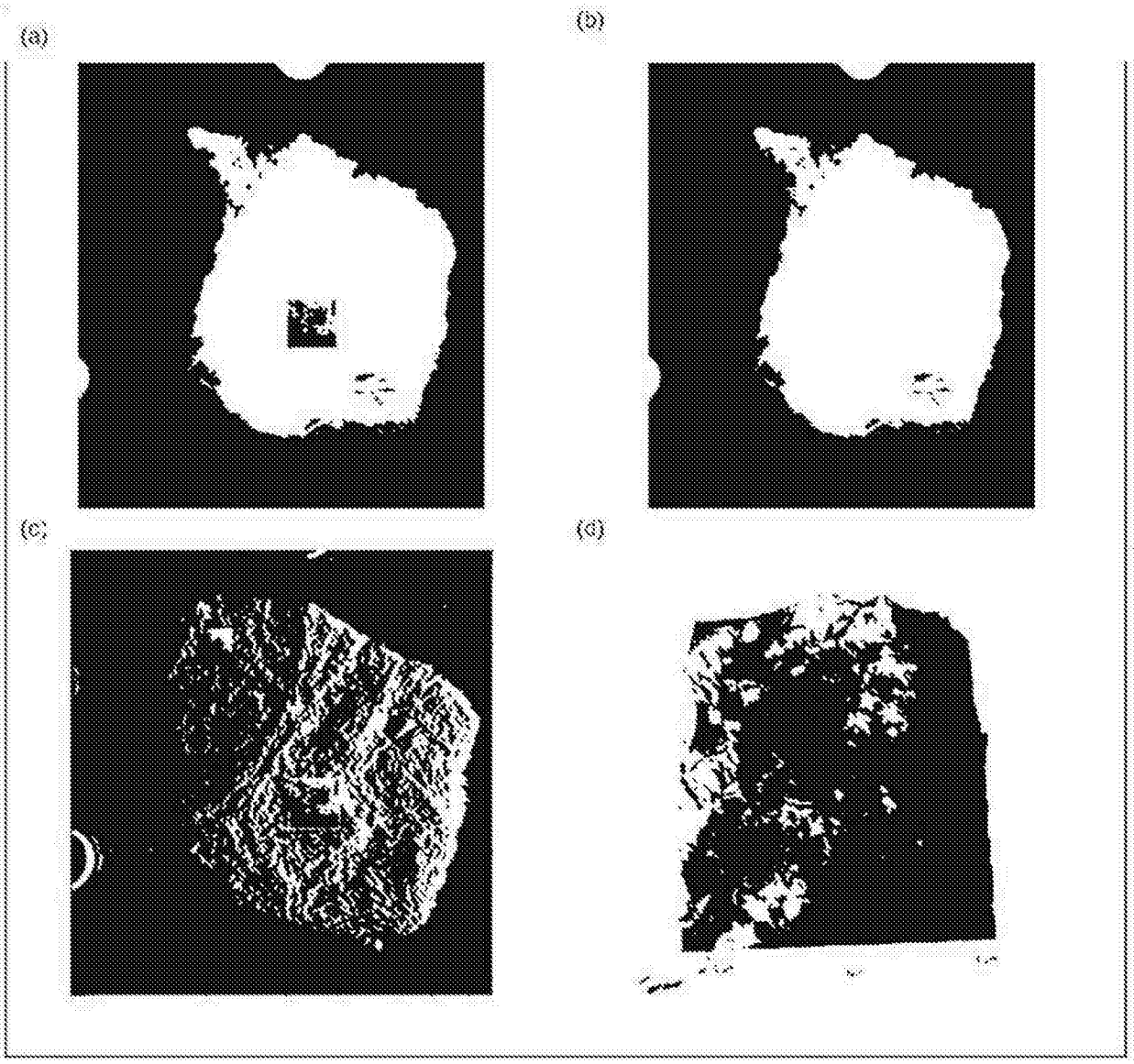
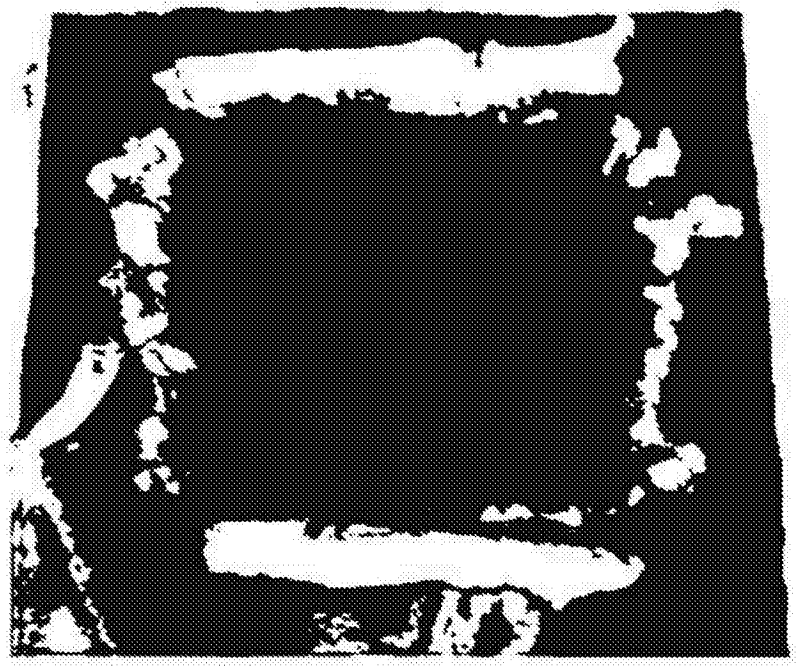


图14



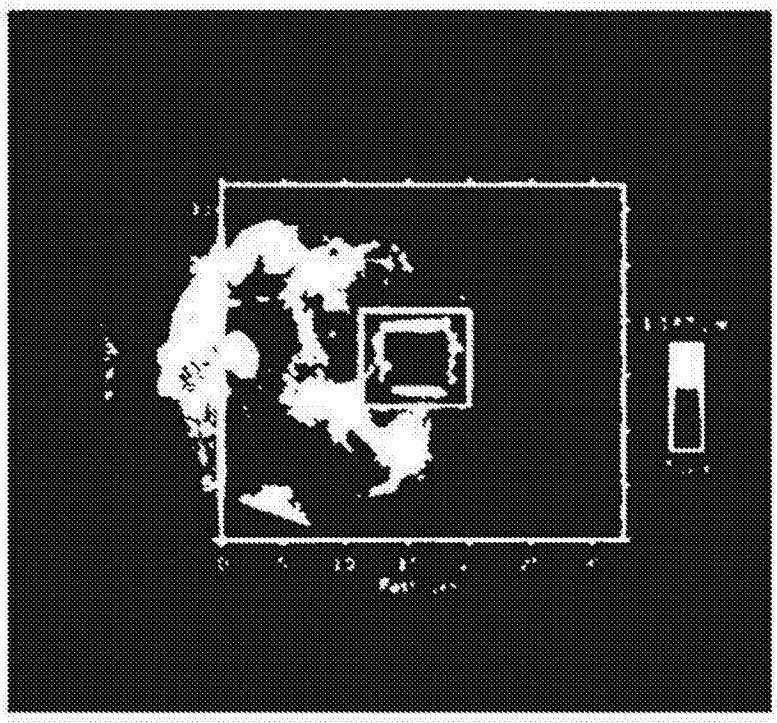
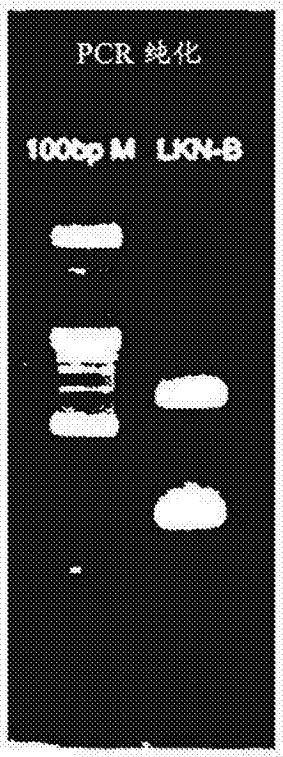
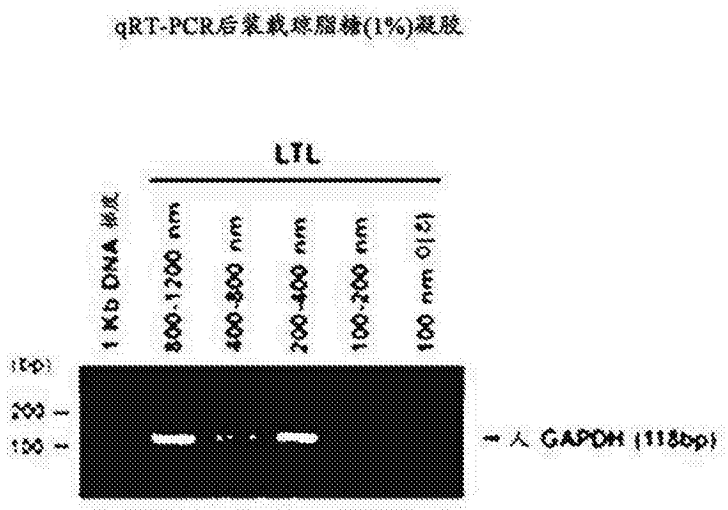


图15



	样品 名称	浓度 (Nanodrop) (ng/ul)	260/280	体积 (ul)	总量 (ng)	QC 结果
1	L(Lliteria)KN-B (PCR純化)	12 389	1.826	23	284 947	通过

图16a



DNA分离，
在2013年6月
于波士顿实施
(<100~1200nm)

图16b

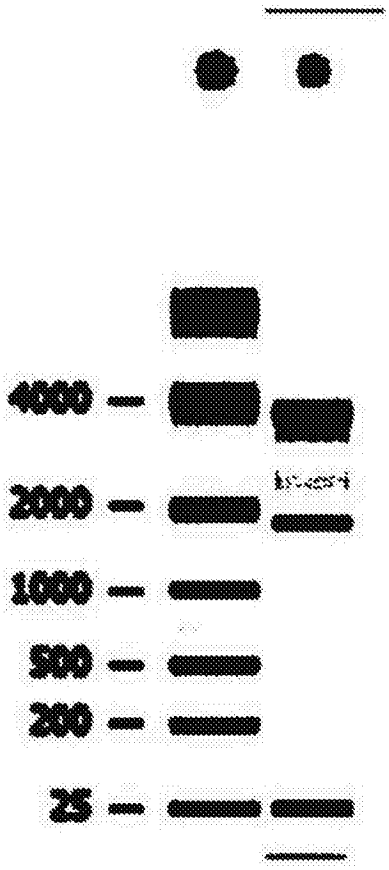
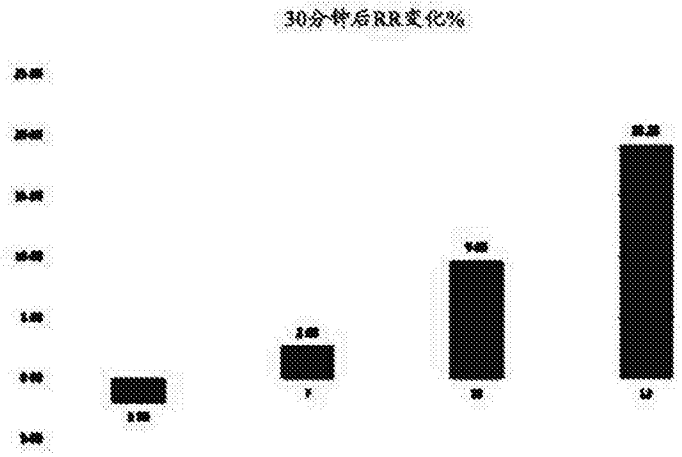


图17



编号	介质	S1.葡萄糖	S2.ADP	E-LTN(SSN 1/0)	描述
	(100mL)	(100mg/mL, 1mL)	(1mM, 1mL)	(100mg/mL,100U/ml)	
6	去离子水	○	○	×	
7	去离子水	○	○	○	
10	去离子水	○	○	○	SSN 1/2H
12	去离子水	○	○	○	SSP 1/2H

图18

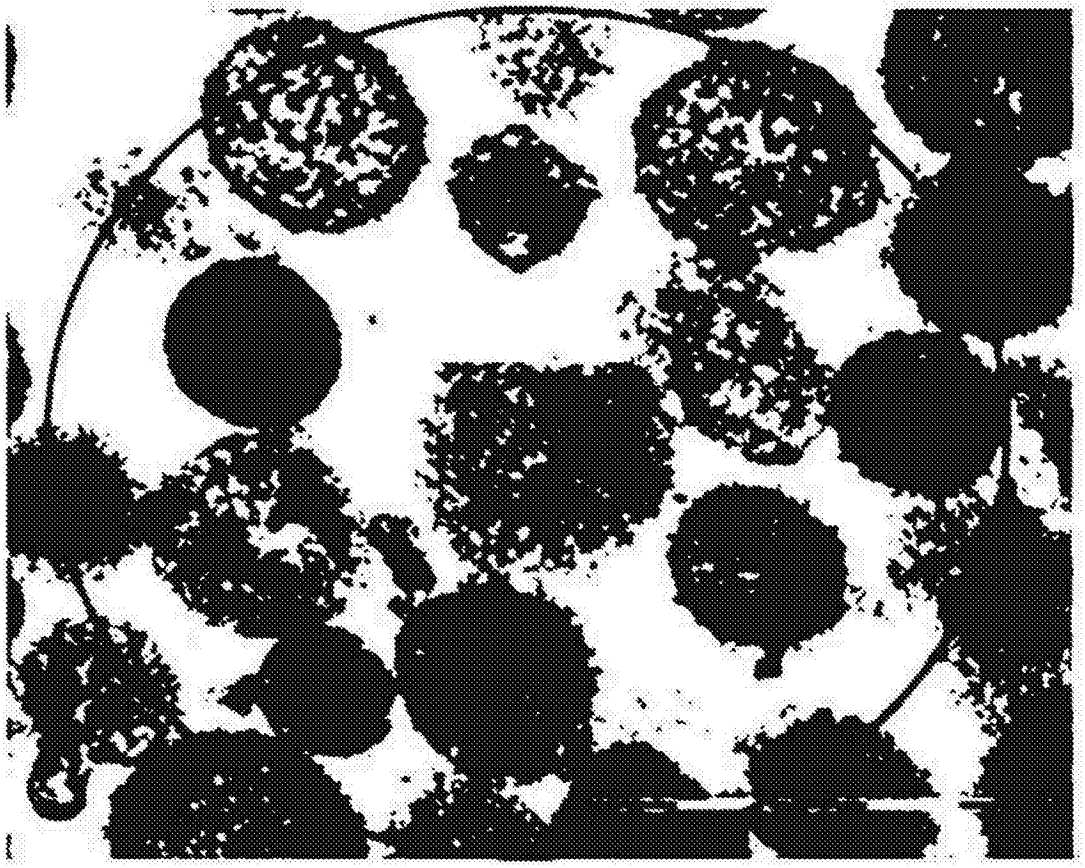


图19

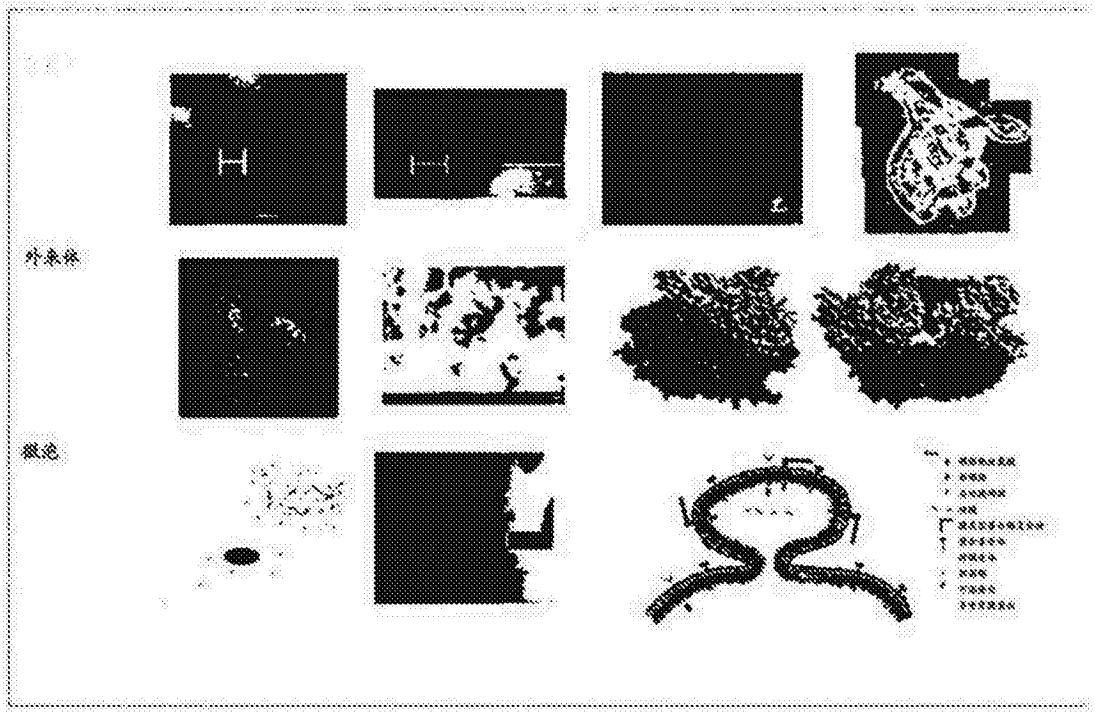


图20

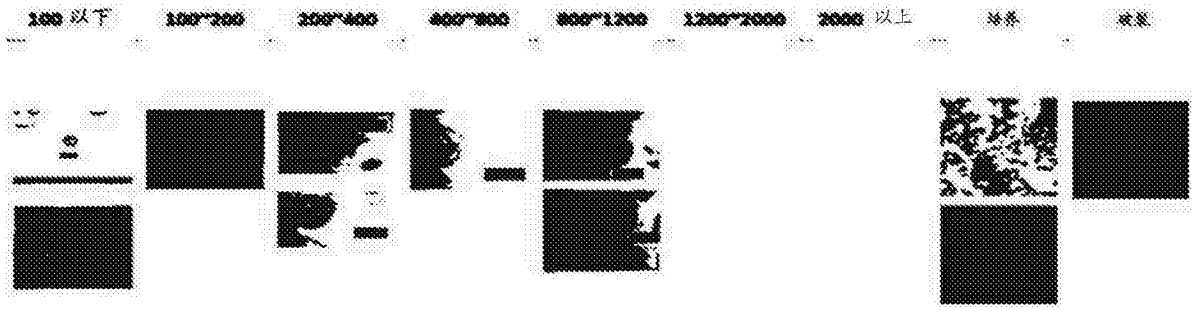

100 以下
100~200
200~400
400~800
800~1200
1200~2000
2000 以上

图21

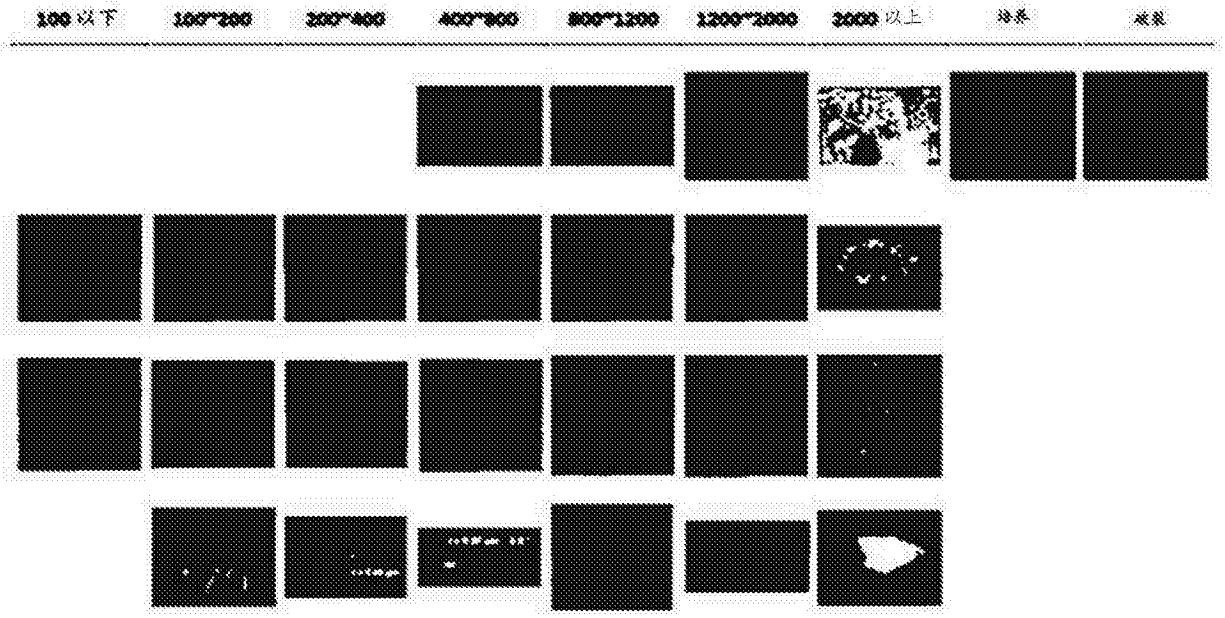

100 以下
100~200
200~400
400~800
800~1200
1200~2000
2000 以上

图22

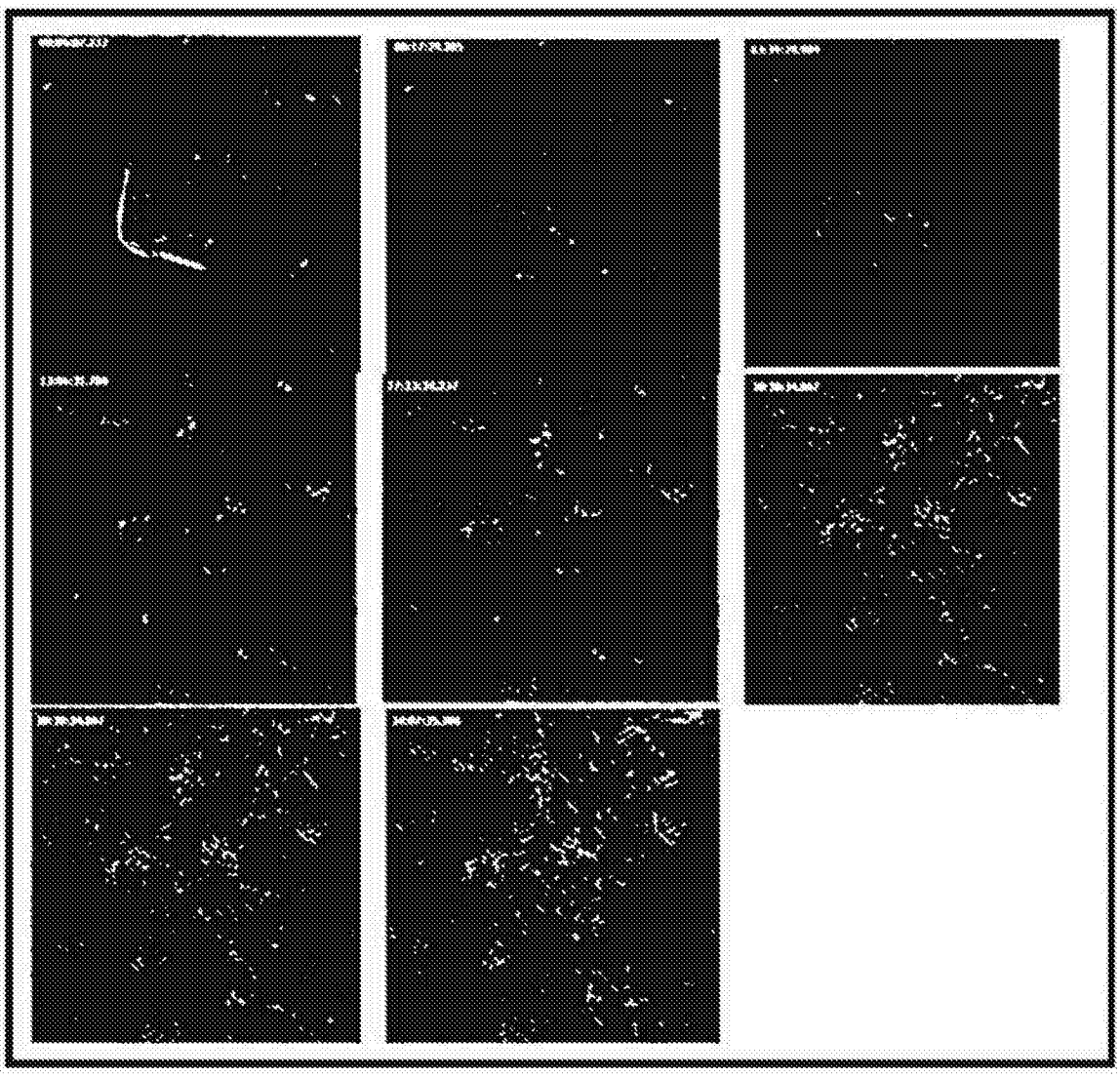


图23

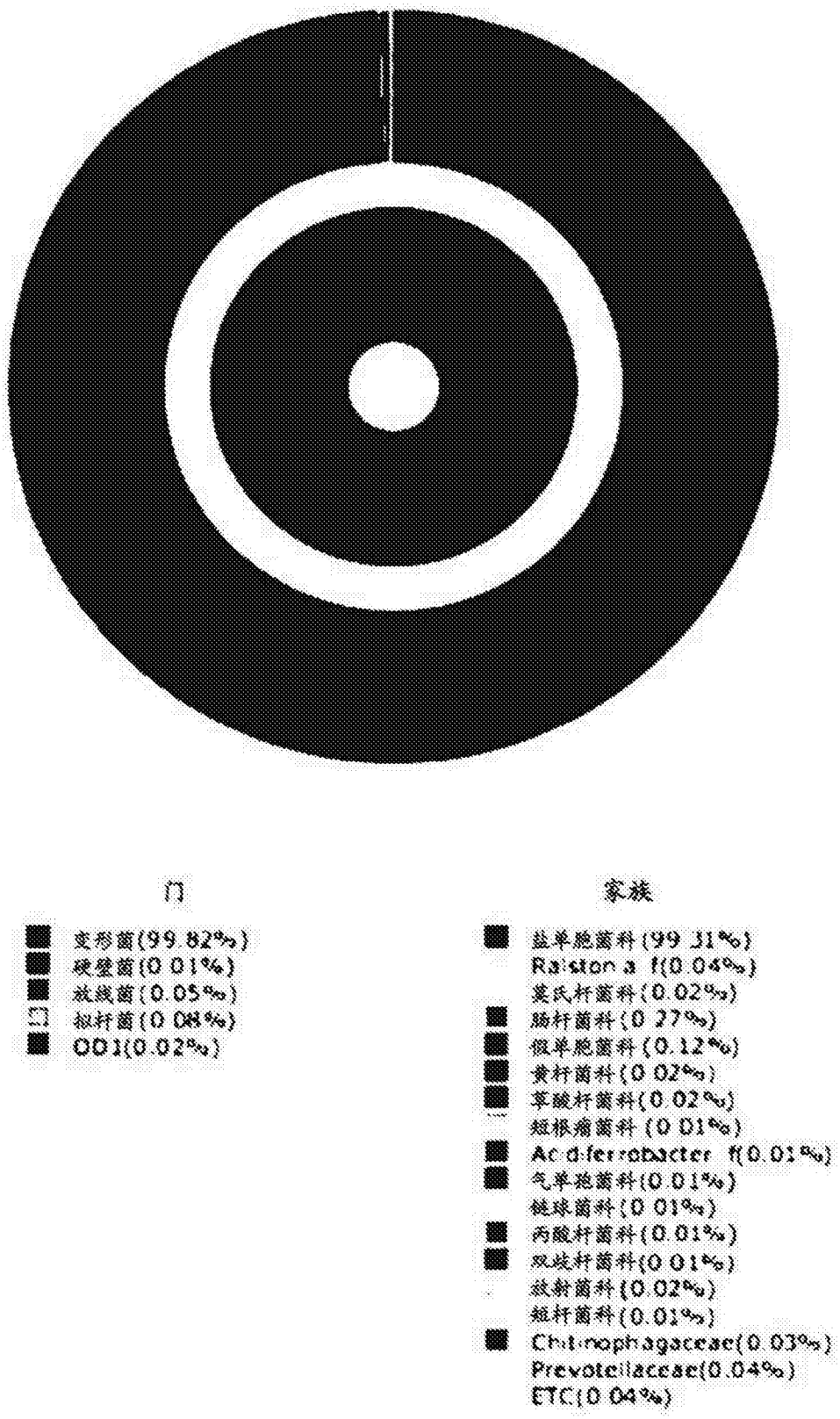

DKU20140414 Fr#1
门
变形菌(99.82%)
硬壁菌(0.01%)
放线菌(0.05%)
拟杆菌(0.04%)
OD1(0.02%)
家族
盐单胞菌科(99.31%)
Ralstonia f(0.04%)
莫氏杆菌科(0.02%)
肠杆菌科(0.27%)
假单胞菌科(0.12%)
黄杆菌科(0.02%)
苹酸杆菌科(0.02%)
短根瘤菌科(0.01%)
Acidiferrobacter f(0.01%)
气单胞菌科(0.01%)
链球菌科(0.01%)
丙酸杆菌科(0.01%)
双歧杆菌科(0.01%)
放射菌科(0.02%)
短杆菌科(0.01%)
Chitinophagaceae(0.03%)
Prevotellaceae(0.04%)
ETC(0.04%)

图24a

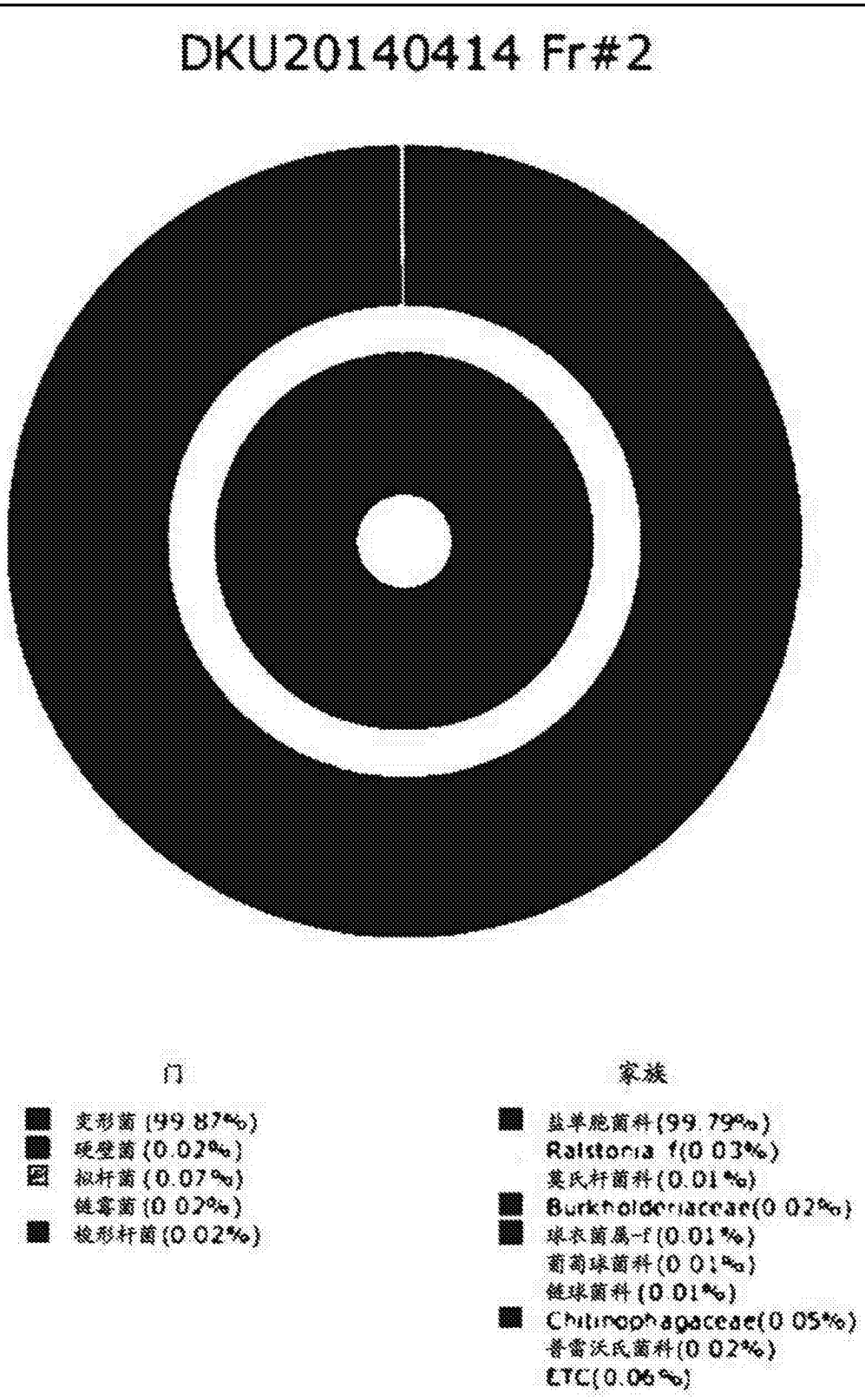

DKU20140414 Fr#2
门
变形菌(99.87%)
硬壁菌(0.02%)
拟杆菌(0.07%)
疣微菌(0.02%)
梭形杆菌(0.02%)
家族
益生菌科(99.79%)
Ralstonia f(0.03%)
莫氏杆菌科(0.01%)
Burkholderiaceae(0.02%)
球衣菌属-f(0.01%)
葡萄球菌科(0.01%)
链球菌科(0.01%)
Chitinophagaceae(0.05%)
普雷沃氏菌科(0.02%)
ETC(0.06%)

图24b

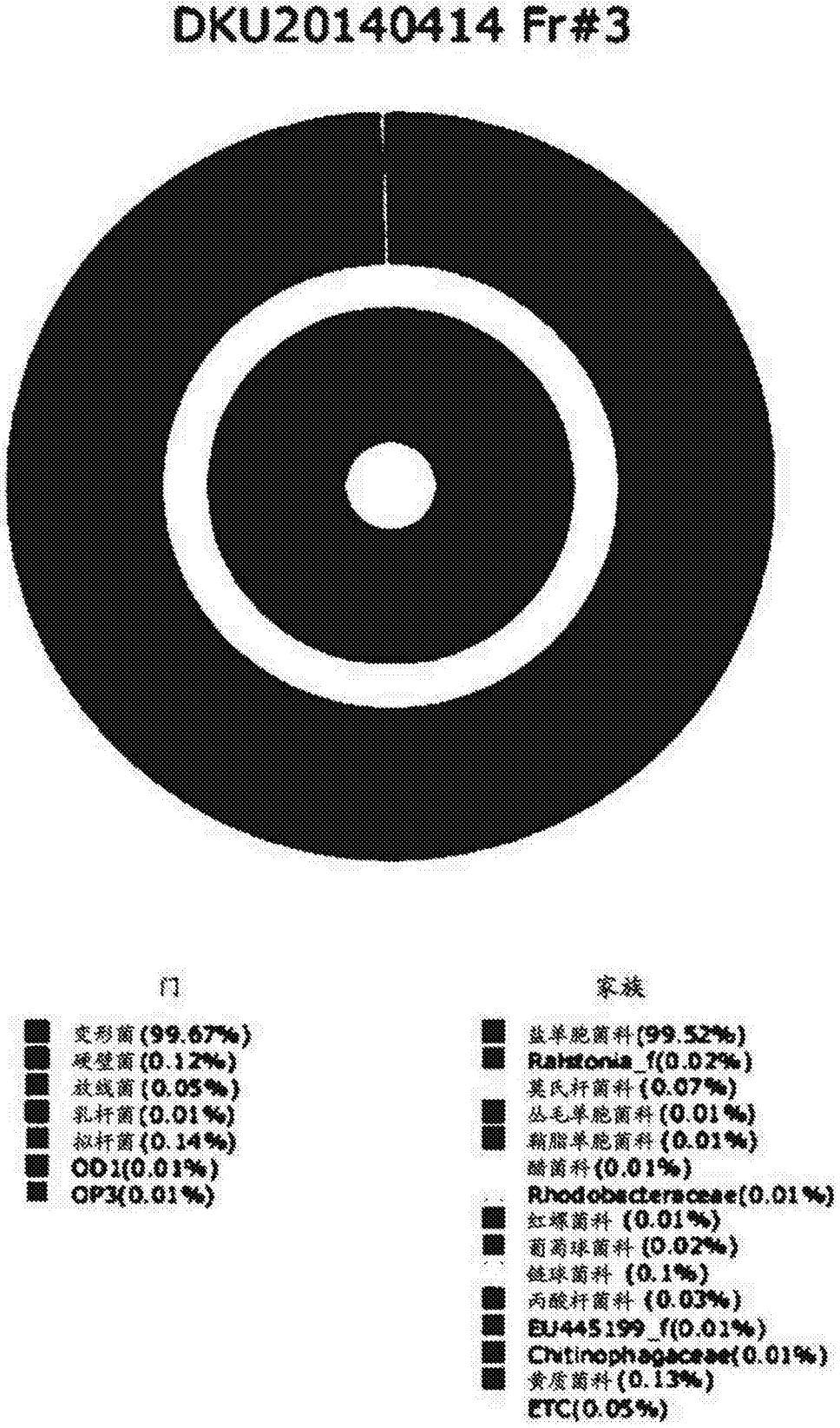

DKU20140414 Fr#3
门
变形菌(99.67%)
硬壁菌(0.12%)
放线菌(0.05%)
乳杆菌(0.01%)
拟杆菌(0.14%)
OD1(0.01%)
OP3(0.01%)
家族
盐单胞菌科(99.52%)
Ralstonia_f(0.02%)
莫氏杆菌科(0.07%)
丛毛单胞菌科(0.01%)
新脂单胞菌科(0.01%)
噬菌科(0.01%)
Rhodobacteraceae(0.01%)
红螺菌科(0.01%)
葡萄球菌科(0.02%)
链球菌科(0.1%)
丙酸杆菌科(0.03%)
EU445199_f(0.01%)
Chitinophagaceae(0.01%)
黄度菌科(0.13%)
ETC(0.05%)

图24c


DKU20140414 Fr#4
门
变形菌(99.93%)
蓝菌(0.01%)
拟杆菌(0.01%)
OD1(0.05%)
家族
盐单胞菌科(99.88%)
Ralstonia_f(0.03%)
Burkholderiaceae(0.01%)
芝菌科(0.01%)
金微菌科(0.01%)
Chitinophagaceae(0.01%)
ETC(0.05%)

图24d

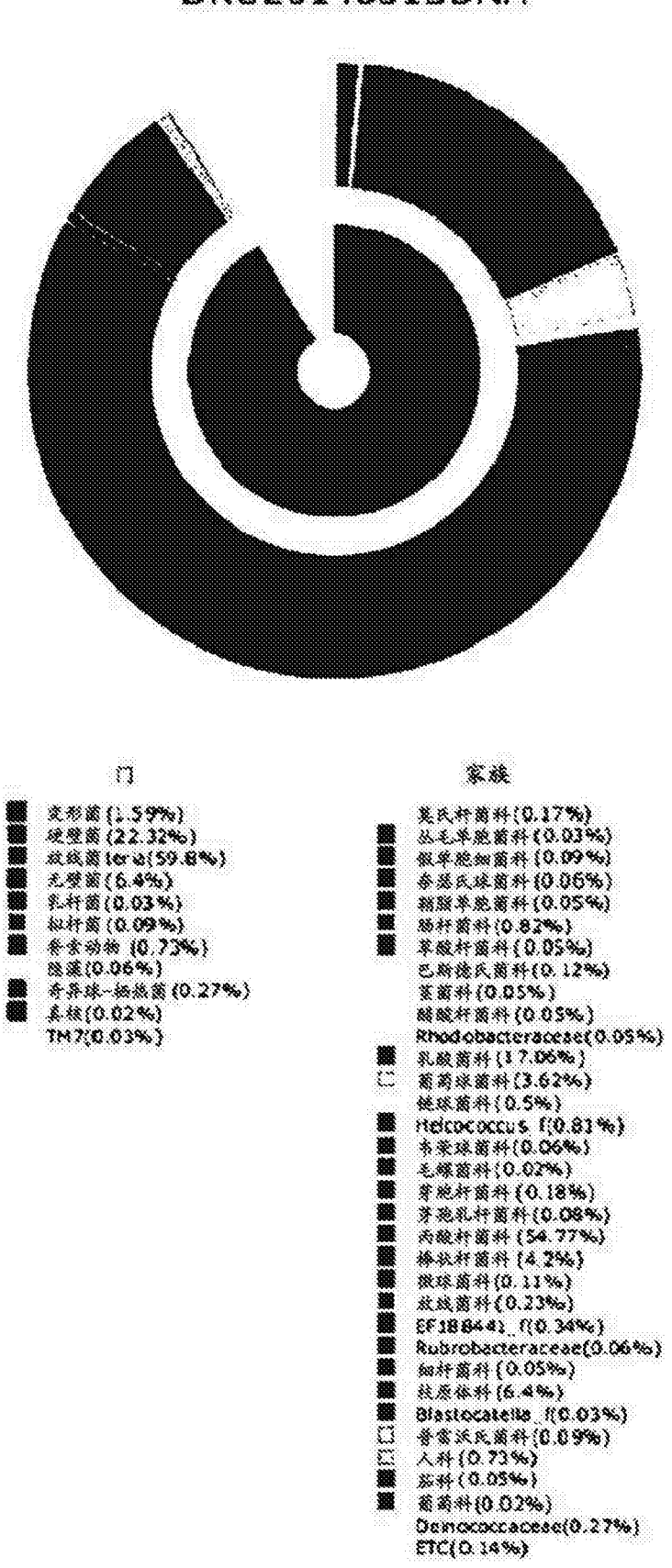

DKU20140313DNA
门
变形菌(1.59%)
硬壁菌(22.32%)
放线菌tera(59.8%)
无壁菌(6.4%)
乳杆菌(0.03%)
拟杆菌(0.09%)
各类动物(0.73%)
酸菌(0.06%)
奇异球-栖热菌(0.27%)
其他(0.02%)
TM7(0.03%)
家族
莫氏杆菌科(0.17%)
丛毛单胞菌科(0.03%)
假单胞菌科(0.09%)
香菇类球菌科(0.06%)
脂肪单胞菌科(0.05%)
肠杆菌科(0.82%)
苯酸杆菌科(0.05%)
巴斯德氏菌科(0.12%)
紫菌科(0.05%)
醋酸杆菌科(0.05%)
Rhodobacteraceae(0.05%)
乳酸菌科(17.06%)
葡萄球菌科(3.62%)
链球菌科(0.5%)
Peptococcus f(0.81%)
韦荣球菌科(0.06%)
毛螺菌科(0.02%)
芽孢杆菌科(0.18%)
芽孢乳杆菌科(0.08%)
肉酸杆菌科(54.77%)
棒状杆菌科(4.2%)
微球菌科(0.11%)
放线菌科(0.23%)
EF188441_f(0.34%)
Rubrobacteraceae(0.06%)
拟杆菌科(0.05%)
软壁体科(6.4%)
Blastocatella_f(0.03%)
普雷沃氏菌科(0.09%)
人科(0.73%)
猪科(0.05%)
葡萄科(0.02%)
Dermacoccaceae(0.27%)
ETC(0.14%)

图25a

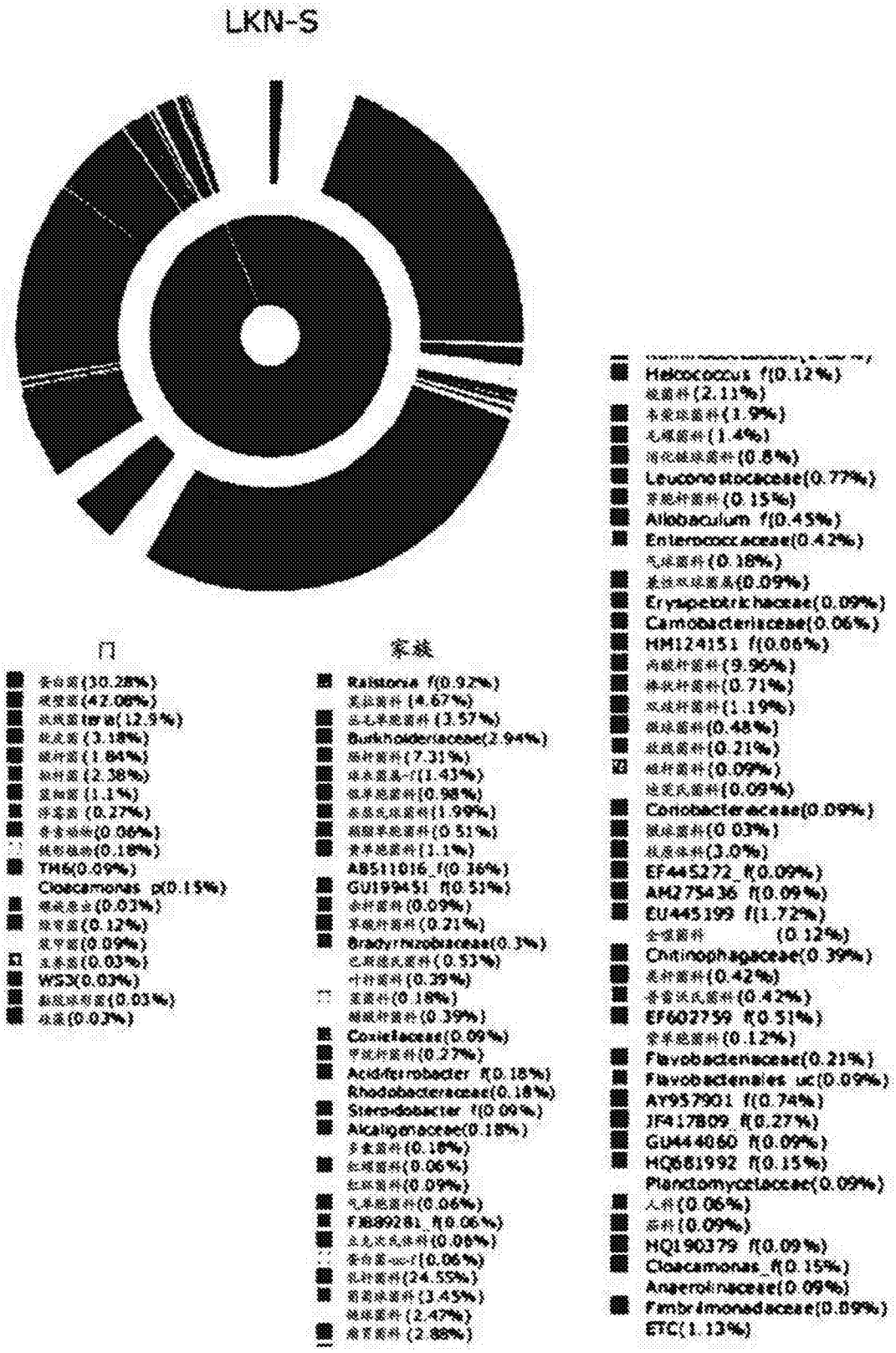

LKN-S
门
家族
Halococcus f(0.12%)
Leuconostocaceae(0.77%)
Allobaculum f(0.45%)
Enterococcaceae(0.42%)
Erysipelotrichaceae(0.09%)
Comamonadaceae(0.06%)
HM124151 f(0.06%)
Flavobacteriaceae(0.21%)
Flavobacteriales_uc(0.09%)
AY957901 f(0.74%)
JF417809_f(0.27%)
GU444060 f(0.09%)
HQ881992 f(0.15%)
Planctomycetaceae(0.09%)
HQ190379 f(0.09%)
Cloacamonas_f(0.15%)
Anaerolinaceae(0.09%)
Fmbrimonadaceae(0.09%)
ETC(1.13%)
Ralstonia f(0.92%)
Burkholderiaceae(2.94%)
AB511016_f(0.36%)
GU199451 f(0.51%)
Bradyrhizobiaceae(0.3%)
Coxiellaceae(0.09%)
Acidithiobacter f(0.18%)
Rhodobacteraceae(0.18%)
Steroidobacter f(0.09%)
Alcaligenaceae(0.18%)
FJ889281_f(0.06%)
Chitinophagaceae(0.39%)
EF602759 f(0.51%)
Clostridiaceae(0.03%)
WS3(0.03%)

图25b

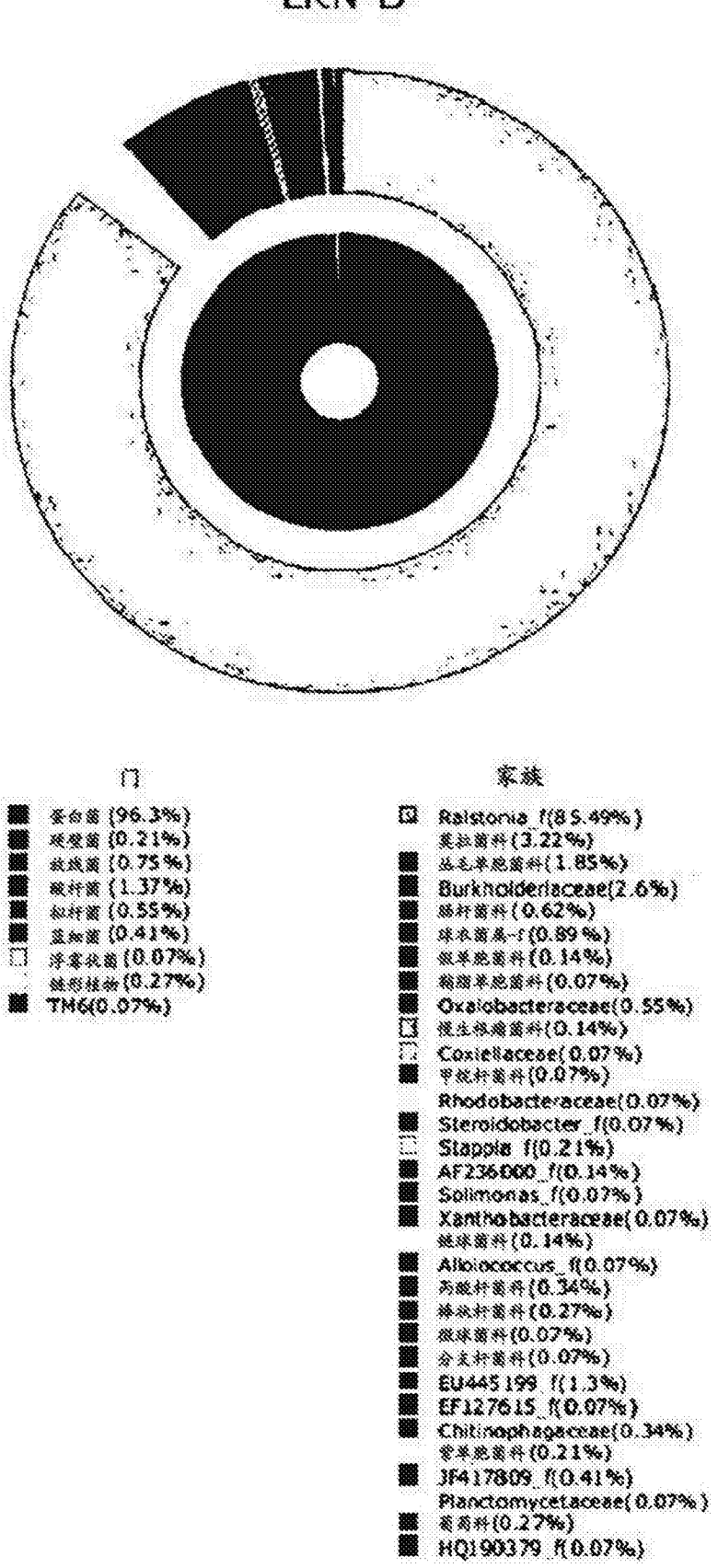


图25c

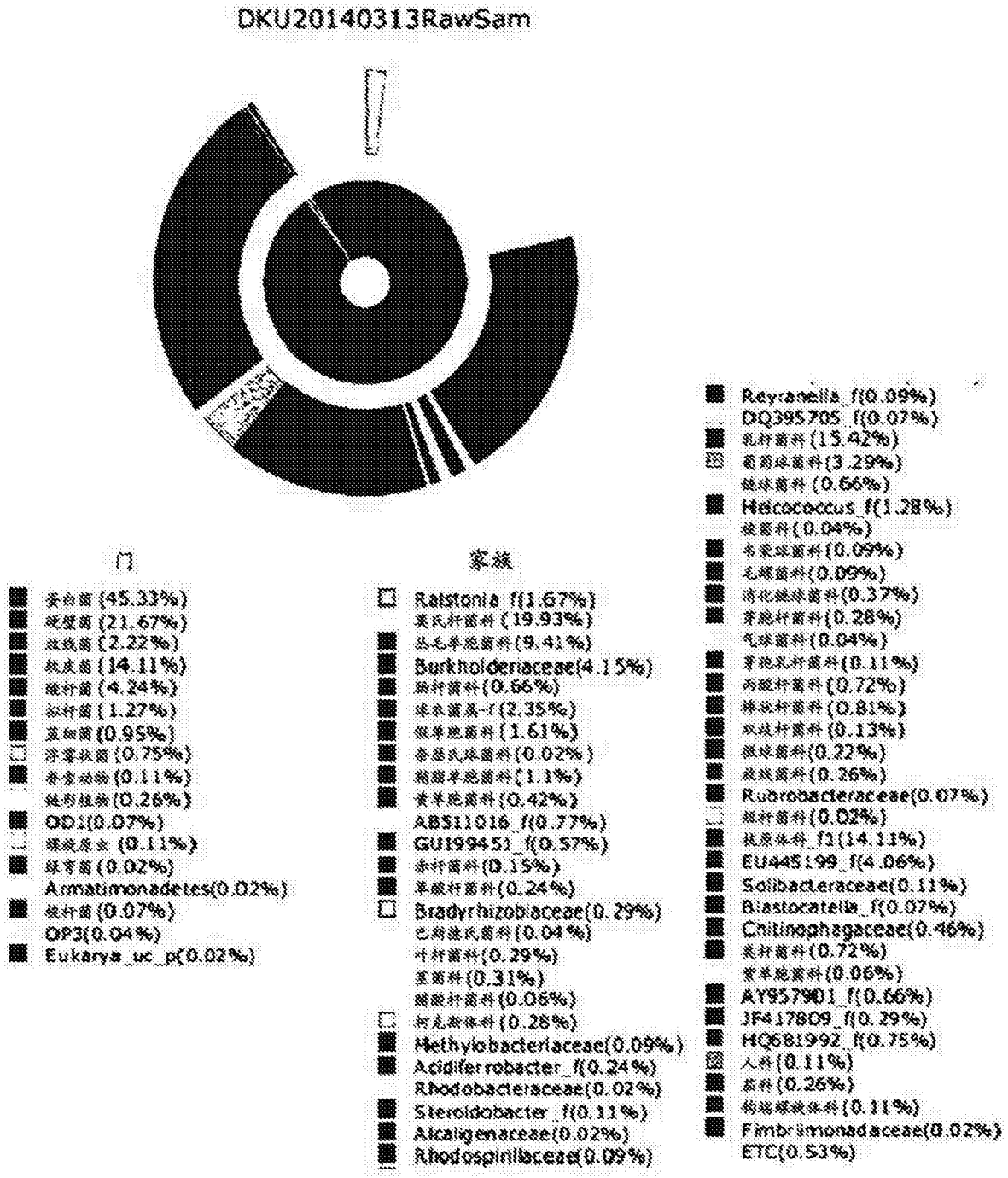

DKU20140313RawSam
门
变形菌(45.33%)
厚壁菌(21.67%)
放线菌(2.22%)
拟杆菌(14.11%)
酸杆菌(4.24%)
芽单胞菌(1.27%)
蓝细菌(0.95%)
浮霉状菌(0.75%)
[illegible](0.11%)
[illegible](0.26%)
OD1(0.07%)
[illegible](0.11%)
绿弯菌(0.02%)
Armatimonadetes(0.02%)
[illegible](0.07%)
OP3(0.04%)
Eukarya_uc_p(0.02%)
家族
Ralstonia_f(1.67%)
[illegible](19.93%)
[illegible](9.41%)
Burkholderiaceae(4.15%)
[illegible](0.66%)
[illegible](2.35%)
[illegible](1.61%)
[illegible](0.02%)
[illegible](1.1%)
[illegible](0.42%)
ABS11016_f(0.77%)
GU199451_f(0.57%)
[illegible](0.15%)
[illegible](0.24%)
Bradyrhizobiaceae(0.29%)
[illegible](0.04%)
[illegible](0.29%)
[illegible](0.31%)
[illegible](0.06%)
[illegible](0.28%)
Methylobacteriaceae(0.09%)
Acidiferrobacter_f(0.24%)
Rhodobacteraceae(0.02%)
Steroidobacter_f(0.11%)
Alcaligenaceae(0.02%)
Rhodospirillaceae(0.09%)
Reyranella_f(0.09%)
DQ395705_f(0.07%)
[illegible](15.42%)
[illegible](3.29%)
[illegible](0.66%)
Helcococcus_f(1.28%)
[illegible](0.04%)
[illegible](0.09%)
[illegible](0.09%)
[illegible](0.37%)
[illegible](0.28%)
[illegible](0.04%)
[illegible](0.11%)
[illegible](0.72%)
[illegible](0.81%)
[illegible](0.13%)
[illegible](0.22%)
[illegible](0.26%)
Rubrobacteraceae(0.07%)
[illegible](0.02%)
[illegible]_f2(14.11%)
EU445199_f(4.06%)
Solibacteraceae(0.11%)
Blastocatella_f(0.07%)
Chitinophagaceae(0.46%)
[illegible](0.72%)
[illegible](0.06%)
AY957901_f(0.66%)
JF417809_f(0.29%)
HQ681992_f(0.75%)
[illegible](0.11%)
[illegible](0.26%)
[illegible](0.11%)
Fimbriimonadaceae(0.02%)
ETC(0.53%)

图25d

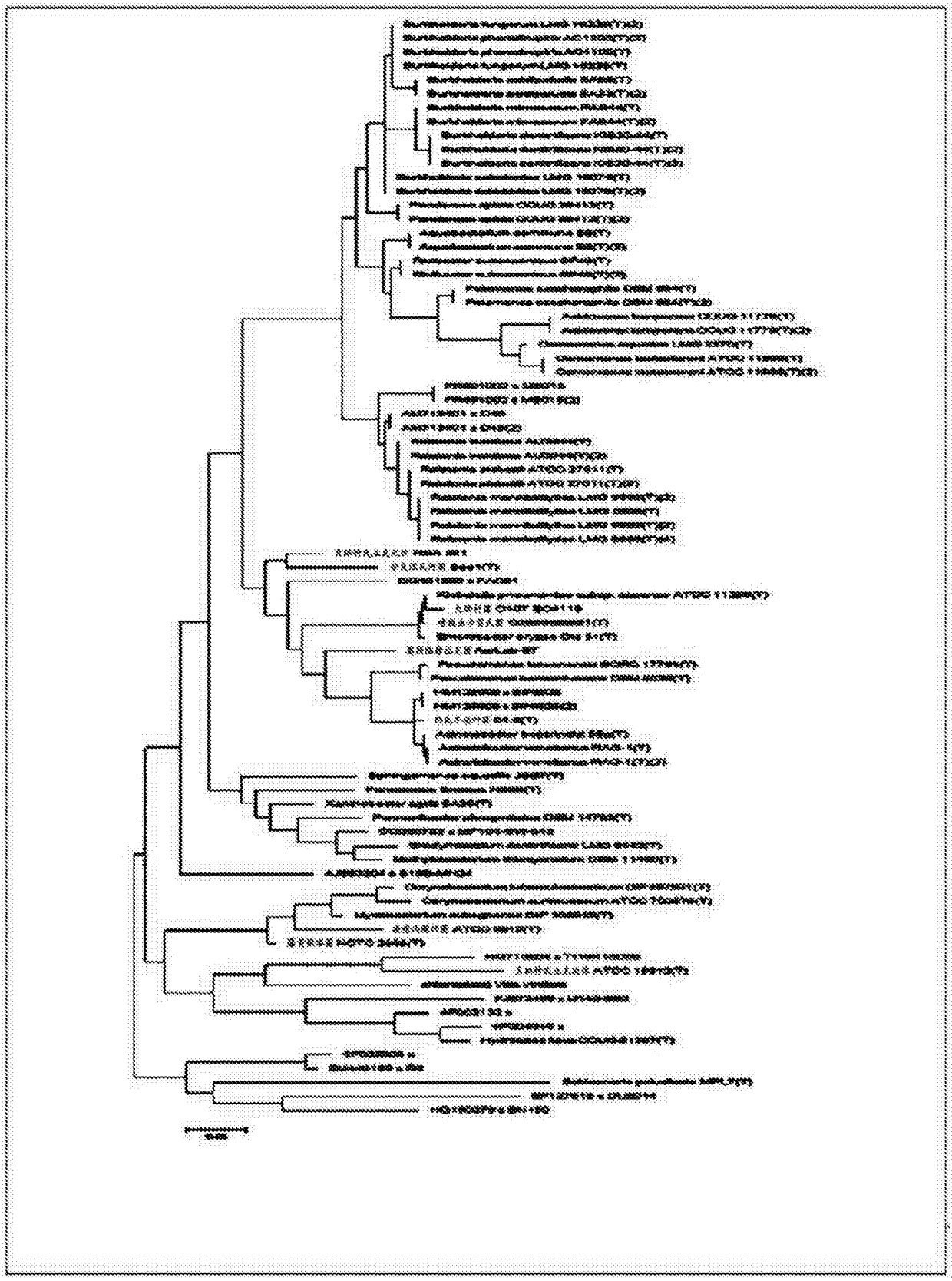


图26a

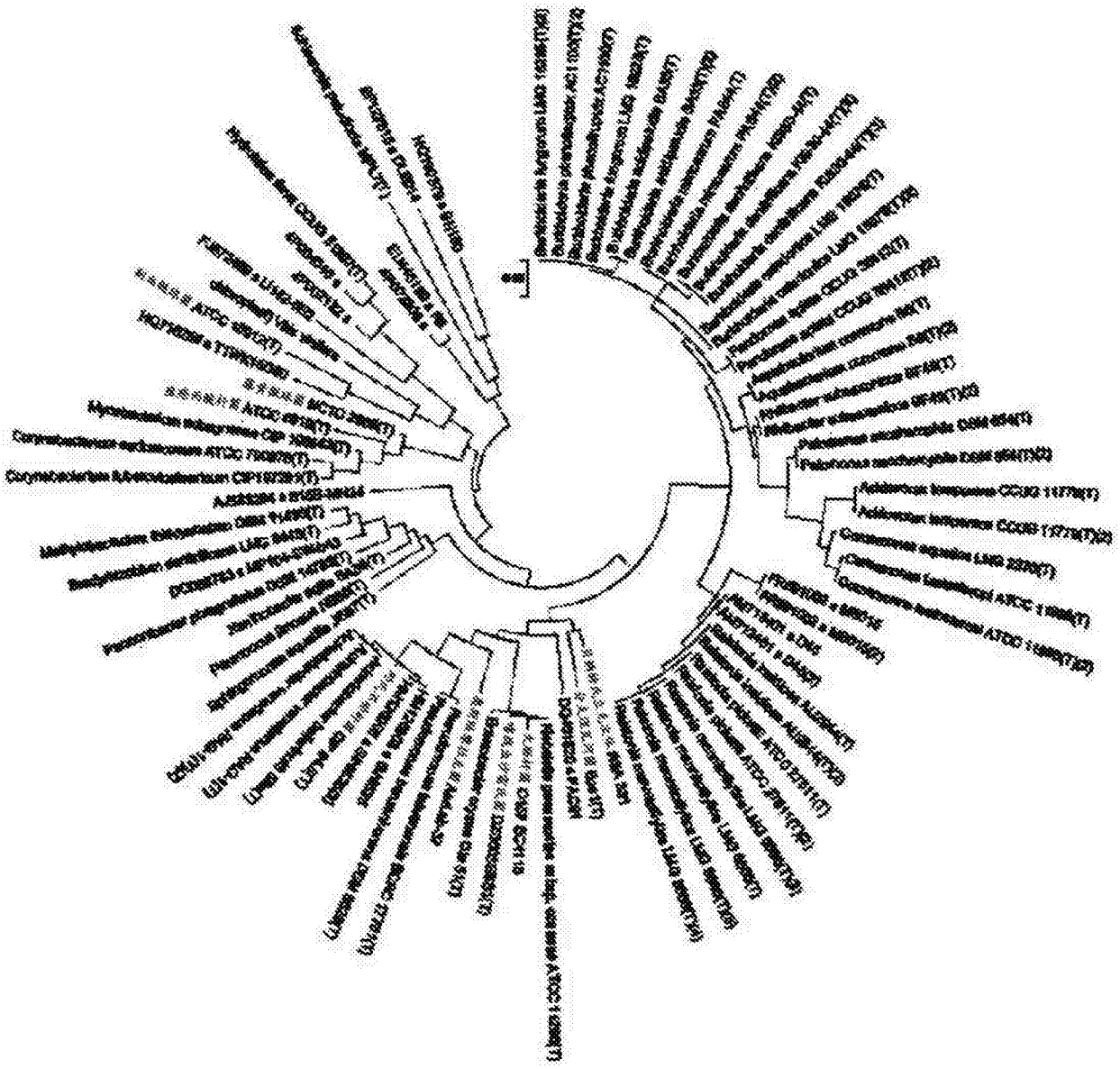


图26b

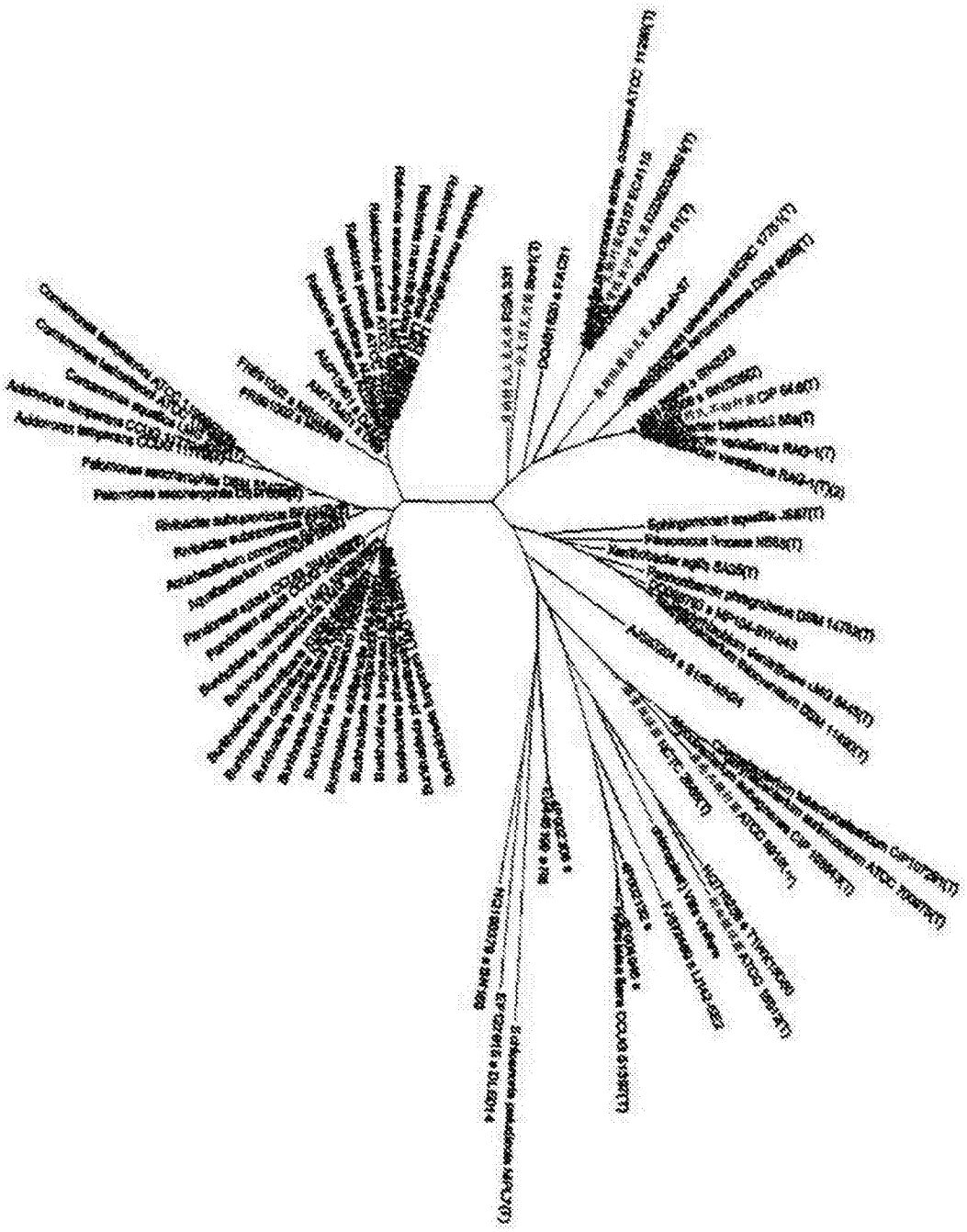


图26c

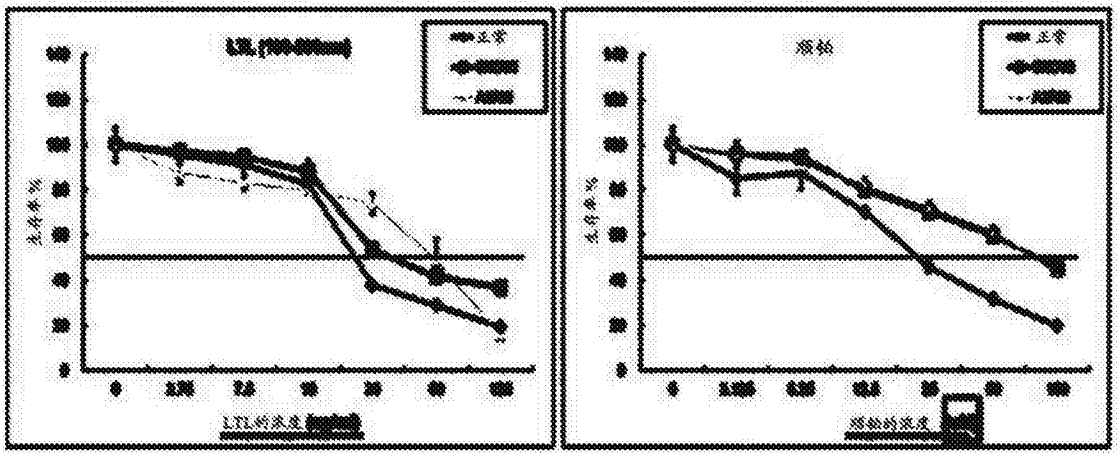


图27