(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 113271796 A
(43)申请公布日 2021.08.17

(21)申请号 201980087923.6
(22)申请日 2019.11.05
(30)优先权数据
62/755,945 2018.11.05 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.07.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/059865 2019.11.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/097077 EN 2020.05.14
(71)申请人 芝加哥大学
地址 美国伊利诺斯州
申请人 克罗施特拉比奥尔公司
(72)发明人 凯瑟琳·R·纳格勒 包日月
狄俄尼索斯·安东诺普洛斯
约翰·W·科尔森
劳伦·安德斯·赫瑟
(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
代理人 邱俊霞 王春伟
(51)Int.Cl.
A23L 33/135(2006.01)
A61K 31/194(2006.01)
A61K 31/225(2006.01)
A61K 31/33(2006.01)
A61K 31/66(2006.01)
A61K 31/664(2006.01)

权利要求书4页 说明书50页 附图29页

(54)发明名称

用于治疗感染性、自身免疫和过敏性疾病的方法和组合物

(57)摘要

本公开内容提供用于治疗食物过敏、感染、自身免疫性疾病和其他过敏性疾病的方法和组合物。因此，本公开内容涉及一种用于治疗对象的感染性疾病、自身免疫性疾病或过敏性疾病的方法，包括向该对象施用包含粪厌氧棒杆菌的组合物。其他方面涉及一种用于治疗对象的食物过敏或用于减少对象对过敏原的过敏反应或用于治疗或预防对象的过敏反应的方法，包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。

CN 113271796 A

1.一种用于治疗对象的食物过敏或用于减少对象对过敏原的过敏反应或用于治疗或预防对象的过敏反应的方法,包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。

2.一种用于治疗具有患食物过敏或过敏反应的风险的患者的方法,包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。

3.一种用于治疗有需要的对象的特应性疾病的方法,所述方法包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。

4.根据权利要求3所述的方法,其中特应性疾病包括湿疹、特应性皮炎、哮喘或过敏性鼻炎。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳糖醇、赤藓糖醇、异麦芽酮糖醇、聚葡糖醇、乙酸盐和乳酸盐中的一种或多于一种。

6.根据权利要求5所述的方法,其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳酸盐、乙酸盐和乳糖醇中的一种或多于一种。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中益生元包括可消化和不可消化的低聚糖中的一种或多于一种。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中益生元包括至少6克不可消化的低聚糖。

9.根据权利要求7或8所述的方法,其中低聚糖包括改性低聚糖。

10.根据权利要求9所述的方法,其中改性低聚糖包括粪厌氧棒杆菌发酵能产生丁酸盐的低聚糖。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中将$1x10^{6}$CFU至$1x10^{15}$CFU的粪厌氧棒杆菌施用给对象。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述方法还包括施用携带丁酸基团的化合物。

13.根据权利要求12所述的方法,其中携带丁酸基团的化合物包括pHPMA-b-pBMA。

14.根据权利要求12或13所述的方法,其中携带丁酸基团的化合物是口服施用的。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中粪厌氧棒杆菌、益生元和/或携带丁酸基团的化合物是同时施用的。

16.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前施用的。

17.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之后施用的。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前至少一小时施用的。

19.根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中携带丁酸基团的化合物是在施用益生元之后施用的。

20.根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中将至少10克益生元施用给对象。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中粪厌氧棒杆菌的菌落形成单位数与益生元的克数之比为1000:1至10000:1。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中食物过敏包括牛奶过敏、鸡蛋过敏、

花生过敏、大豆过敏、小麦/麸质过敏、贝类过敏、芝麻过敏或树坚果过敏。

23.根据权利要求1至22中任一项所述的方法，其中对象已被诊断有食物过敏或特应性疾病。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的方法，其中对象之前已被治疗过食物过敏或特应性疾病。

25.根据权利要求24所述的方法，其中对象已被确定耐受先前的治疗。

26.根据权利要求1至25中任一项所述的方法，其中对象是人类。

27.根据权利要求26所述的方法，其中对象小于一岁、小于五岁、小于十二岁或小于十八岁。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌包括活细菌产物。

29.根据权利要求1至28中任一项所述的方法，其中细菌是冻干或冷冻干燥的。

30.根据权利要求1至29中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌和/或益生元是口服施用的。

31.根据权利要求30所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌和/或益生元是在片剂或胶囊中施用的。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用含乳酸盐的配方奶或食物。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法，其中对象被确定为保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率小于3。

34.一种用于诊断对象患有食物过敏的方法，所述方法包括确定保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率，其中当比率小于3时，将对象诊断为患有食物过敏。

35.根据权利要求34所述的方法，其中所述方法还包括向诊断为患有食物过敏的对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物治疗所述对象。

36.根据权利要求35所述的方法，其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳糖醇、赤藓糖醇、异麦芽酮糖醇、聚葡糖醇、乳酸盐和乙酸盐中的一种或多于一种。

37.根据权利要求36所述的方法，其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳酸盐、乙酸盐和乳糖醇中的一种或多于一种。

38.根据权利要求35至37中任一项所述的方法，其中益生元包括可消化和不可消化的低聚糖中的一种或多于一种。

39.根据权利要求35至38中任一项所述的方法，其中益生元包括至少6克不可消化的低聚糖。

40.根据权利要求38或39所述的方法，其中低聚糖包括改性低聚糖。

41.根据权利要求40所述的方法，其中改性低聚糖包括粪厌氧棒杆菌发酵能产生丁酸盐的低聚糖。

42.根据权利要求35至41中任一项所述的方法，其中将$1x10^{6}$CFU至$1x10^{15}$CFU的粪厌氧棒杆菌施用给对象。

43.根据权利要求35至42中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用携带丁酸基团的化合物。

44.根据权利要求43所述的方法，其中携带丁酸基团的化合物包括pHPMA-b-pBMA。

45.根据权利要求43或44所述的方法，其中携带丁酸基团的化合物是口服施用的。

46.根据权利要求35至45中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌、益生元和/或携带丁酸基团的化合物是同时施用的。

47.根据权利要求35至42中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前施用的。

48.根据权利要求35至42中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之后施用的。

49.根据权利要求35至48中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌是在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前至少1小时施用的。

50.根据权利要求43至49中任一项所述的方法，其中携带丁酸基团的化合物是在施用益生元之后施用的。

51.根据权利要求35至50中任一项所述的方法，其中将至少10克益生元施用给对象。

52.根据权利要求35至51中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌的菌落形成单位数与益生元的克数之比为1000:1至10000:1。

53.根据权利要求34至52中任一项所述的方法，其中食物过敏包括牛奶过敏。

54.根据权利要求34至53中任一项所述的方法，其中对象没有被诊断患有食物过敏和/或没有表现出食物过敏的症状。

55.根据权利要求34至54中任一项所述的方法，其中对象是人类。

56.根据权利要求55所述的方法，其中对象小于一岁、小于五岁、小于十二岁或小于十八岁。

57.根据权利要求35至56中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌包括活细菌产物。

58.根据权利要求35至57中任一项所述的方法，其中细菌是冻干或冷冻干燥的。

59.根据权利要求35至58中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌和/或益生元是口服施用的。

60.根据权利要求59所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌和/或益生元是在片剂或胶囊中施用的。

61.根据权利要求35至60中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用含乳酸盐的配方奶或食物。

62.一种组合物，其包含粪厌氧棒杆菌和益生元。

63.根据权利要求62所述的组合物，其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳糖醇、赤藓糖醇、异麦芽酮糖醇、聚葡糖醇中的一种或多于一种。

64.根据权利要求63所述的组合物，其中益生元包括低聚半乳糖、乳果糖和乳糖醇中的一种或多于一种。

65.根据权利要求62至64中任一项所述的组合物，其中所述组合物还包含携带丁酸基团的化合物。

66.根据权利要求65所述的组合物，其中携带丁酸基团的化合物包括pHPMA-b-pBMA。

67.根据权利要求62至64中任一项所述的组合物，其中益生元包括可消化和不可消化的低聚糖的一者或两者。

68.根据权利要求62至67中任一项所述的组合物，其中益生元包括至少6克不可消化的

低聚糖。

69.根据权利要求67或68所述的组合物，其中低聚糖包括改性低聚糖。

70.根据权利要求69所述的组合物，其中改性低聚糖包括粪厌氧棒杆菌发酵能产生丁酸盐的低聚糖。

71.根据权利要求62至70中任一项所述的组合物，其中粪厌氧棒杆菌的剂量为$1x10^{6}$CFU至$1x10^{15}$CFU。

72.根据权利要求62至71中任一项所述的组合物，其中粪厌氧棒杆菌的菌落形成单位数与益生元的克数之比为1000:1至10000:1。

73.根据权利要求62至72中任一项所述的组合物，其中组合物还包含药物赋形剂。

74.根据权利要求62至73中任一项所述的组合物，其中将组合物配制为口服施用。

75.一种片剂、胶囊或散剂，其包含根据权利要求62至74中任一项所述的组合物。

76.一种用于治疗对象的感染性疾病、自身免疫性疾病或过敏性疾病的方法，包括向该对象施用包含粪厌氧棒杆菌的组合物。

77.根据权利要求76所述的方法，其中疾病包括特应性疾病。

78.根据权利要求77所述的方法，其中特应性疾病包括湿疹、特应性皮炎、哮喘或过敏性鼻炎。

79.根据权利要求76至78中任一项所述的方法，其中将$1x10^{6}$CFU至$1x10^{15}$CFU的粪厌氧棒杆菌施用给对象。

80.根据权利要求76至79中任一项所述的方法，其中对象已被诊断为患有感染性疾病、自身免疫性疾病或过敏性疾病。

81.根据权利要求1至23中任一项所述的方法，其中对象之前已被治疗过感染性疾病、自身免疫性疾病或过敏性疾病。

82.根据权利要求81所述的方法，其中对象已被确定耐受先前的治疗。

83.根据权利要求76至82中任一项所述的方法，其中对象是人类。

84.根据权利要求83所述的方法，其中对象小于一岁、小于五岁、小于十二岁或小于十八岁。

85.根据权利要求76至84中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌包括活细菌产物。

86.根据权利要求76至85中任一项所述的方法，其中细菌是冻干或冷冻干燥的。

87.根据权利要求76至86中任一项所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌是口服施用的。

88.根据权利要求87所述的方法，其中粪厌氧棒杆菌是在片剂或胶囊中施用的。

89.根据权利要求76至88中任一项所述的方法，其中所述方法还包括施用含乳酸盐的配方奶或食物。

90.根据权利要求76至89中任一项所述的方法，其中对象被确定为保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率小于3。

用于治疗感染性、自身免疫和过敏性疾病的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年11月5日提交的美国临时专利申请第62/755945号的优先权权益，其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

1.技术领域

[0003] 本发明涉及分子生物学和医药领域。

[0004] 2.背景技术

[0005] 在西方社会中，疾病流行的世代显著增加已经使食物过敏成为主要的公共卫生问题(1,2)。关于发病率迅速上升的一种假设提出最近的生活方式因素，包括频繁使用抗生素、饮食变化以及剖腹产率和配方奶喂养率较高，已经改变了肠道共生菌群的组成，增加了对过敏性疾病的易感性。宿主菌群相互作用对于建立适当的免疫稳态是必不可少的，通常被称为失调的自然选择的细菌种群的扰动与许多不同的病理学有联系。几项研究表明，生命早期的失调可能尤其有害(3,4)。

[0006] 本领域需要修饰微生物组以有效治疗过敏和其他相关病症的组合物。

发明内容

[0007] 本公开内容通过提供用于治疗食物过敏、感染性病况、自身免疫性病况和其他特应性病况的方法和组合物满足了本领域的需要。因此，本公开内容涉及一种用于治疗对象的感染性、自身免疫性或过敏性疾病的方法，包括向该对象施用包含粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)的组合物。其他方面涉及一种用于治疗对象的食物过敏或用于减少对象对过敏原的过敏反应或用于治疗或预防对象的过敏反应的方法，包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。在一些方面，方法涉及治疗对象的食物过敏，包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。在一些方面，方法涉及治疗具有患食物过敏或过敏反应或发展成食物过敏或过敏反应的风险的对象，包括向该对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。例如，对象可能由于具有食物过敏的家族病史或对食物过敏的遗传易感性而具有风险，或者由于意外暴露于过敏原而具有过敏反应的风险。在一些方面，对象具有不利的微生物特征，或有表明对象可能存在或可能发展为食物过敏的迹象。在其他方面，方法涉及减少对象对过敏原的过敏反应，包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。在其他方面，该方法涉及治疗或预防对象的过敏反应，包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。其他方面还涉及一种用于治疗有需要的对象的特应性疾病的方法，所述方法包括向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。在一些方面，方法通过向对象施用包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物用于治疗对象的特应性。

[0008] 其他方面涉及一种用于诊断对象患有食物过敏的方法，该方法包括确定保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率；其中当比率小于3时，将对象诊断为患有食物过敏。其

他方面涉及一种用于诊断对象患有过敏性疾病、感染或自身免疫性疾病的方法，该方法包括确定保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率；其中当该比率小于3时，对象被诊断为患有过敏性疾病、感染或自身免疫性疾病。在一些实施方案中，保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率小于、大于或约为6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或0.5(或其中任意衍生范围)。

[0009] 本公开内容的其他方面涉及包含粪厌氧棒杆菌和益生元的组合物。其他方面涉及包含本公开内容的组合物的片剂、胶囊或散剂。

[0010] 下面描述的是可以与上文和此处所描述的任何方面一起使用的具体实施方案。

[0011] 在以上所公开的方面的一些实施方案中，所述方法涉及治疗特应性疾病。在一些实施方案中，特应性疾病包括湿疹、特应性皮炎、哮喘或过敏性鼻炎。

[0012] 在一些实施方案中，该方法用于减少对象对过敏原的过敏反应。在一些实施方案中，对象已经被确定表现出对过敏原的过敏反应。过敏反应可以呈现多种形式，并具有多个严重度或强度级别。这些过敏反应可以因人而异，而且对于任意个体，它们会随时间而变化。本领域已知并描述了用于对反应的严重度或强度进行评分的系统。例如，Sampson等人，J.Allergy Clin.Immunol.第130卷(6)，第1260页(2012)描述了一种评分系统，其通过引用并入本文用于所有目的。应当理解，减少过敏反应的表述是指降低如通过本领域已知的评分系统所测量的过敏反应的严重度或强度。在一些实施方案中，减少过敏反应涉及过敏反应在统计学上显著减少。在一些实施方案中，降低了多个人类或动物群体上的过敏反应的平均严重度或强度。在一些实施方案中，过敏反应可以指对任何特应性疾病的反应，除食物过敏以外，所述特应性疾病包括湿疹、哮喘和过敏性鼻炎。在一些实施方案中，过敏反应降低了如根据Sampson等人所述的评分系统所评分的至少一个等级。例如，在某些实施方案中，过敏反应从3级降到2级。在一些实施方案中，过敏反应从2级降到1级。在一些实施方案中，过敏反应从1级降到0级。在一些实施方案中，过敏反应从3级降到1级。在一些实施方案中，过敏反应从3级降到0级。在一些实施方案中，过敏反应从2级降到0级。

[0013] 术语“益生元”是指聚合度为二或大于二的低聚糖或多聚糖，它们在进入上胃肠道例如小肠之前不易消化或降解，并且可被结肠内的微生物或其他过程发酵或消化，其中经发酵或消化的低聚糖或其消化副产物改变了微生物组或对人类或动物有益。

[0014] 在一些实施方案中，所述方法用于治疗过敏反应。在一些实施方案中，过敏反应来自食物过敏。在一些实施方案中，过敏反应来自药物过敏。在一些实施方案中，过敏反应来自昆虫叮咬。

[0015] 在一些实施方案中，短链低聚糖的聚合度为至少、至多或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50、60、65、70、75。在一些实施方案中，益生元包括低聚半乳糖(GOS)。GOS可以经常发现大量存在于人乳中，人乳包含大量乳糖，并且可以被β-半乳糖苷酶降解。GOS的具体实例包括水苏糖、棉子糖、毛蕊花糖、β(1-4)-半乳糖基乳糖(4′-低聚半乳糖)和β(1-6)-半乳糖基乳糖(6′-低聚半乳糖)和乳果糖。在一些实施方案中，益生元包括果聚糖(包括短链低聚果糖(scFOS)、低聚果糖(FOS)和菊粉)、半乳聚糖、葡聚糖和其他低聚糖。这样的实例包括短链FOS(相对于下面的果糖链更短，聚合度为2至4)；低聚果糖(聚合度为4至20)；菊粉(聚合度>20)或梯牧草果聚糖(phlein)；大豆低聚糖(SOS)；低聚半乳糖(GOS)；低聚异麦芽糖(IMOS)(衍生自小麦、大麦、

玉米、燕麦、木薯、大米、马铃薯中的淀粉)，包括异麦芽糖、异麦芽三糖和潘糖；大豆低聚糖(SOS)(来自大豆)，包括棉子糖和四糖水苏糖；低聚木糖(XOS)，包括木聚糖、木二糖、木三糖和木四糖(衍生自竹笋、水果、蔬菜、牛奶和蜂蜜中的淀粉)；果胶低聚糖(POS)，包括果胶；壳低聚糖，包括甲壳质；乳果糖；β-葡聚糖(来自谷物，如燕麦、大麦、小麦和黑麦)；和III型抗性淀粉，包括在含淀粉的食物(例如意面、马铃薯和大米)冷却时形成的抗性淀粉。其他实例包括多元醇，例如异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、乳糖醇、赤藓糖醇和聚葡糖醇(polyglycitol)。多元醇的来源包括苹果、杏、牛油果、黑莓、樱桃、荔枝、油桃、桃、梨、李子、西梅、西瓜、花椰菜和蘑菇。其他实例包括非果聚糖类如糊精，包括麦芽糖糊精、环糊精和焦糊精(衍生自马铃薯和玉米淀粉)、小麦糊精、高直链玉米淀粉(和玉米淀粉)、直链淀粉和支链淀粉。在一些实施方案中，益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳糖醇、赤藓糖醇、异麦芽酮糖醇、聚葡糖醇、乙酸盐和乳酸盐中的一种或多于一种。在一些实施方案中，益生元包括低聚半乳糖、乳果糖、乳酸盐、乙酸盐和乳糖醇中的一种或多于一种。

[0016] 本发明还包括本文所述化合物的衍生物和处理后的形态。衍生物或处理后的形态可以被修饰以改变益生元的发酵性质，例如通过使益生元更易于消化、对某种类型的细菌更具特异性，或增加发酵产物如短链脂肪酸(SCFA)和/或其他代谢物的产量。还包括已知包含一定量的这些化合物和/或能够具有益生元效果的食物和食物衍生物。可以处理这些食物以分离它们的淀粉，或者可以不分离它们的淀粉而施用，例如将整个食物磨碎使用。这些食物的例子包括：洋葱、朝鲜蓟、大蒜、小麦、香蕉、芦笋、菊苣、韭葱、番茄、竹笋、水果、蔬菜、牛奶、蜂蜜、小麦、黑麦、大麦、玉米、燕麦、木薯、大米和马铃薯。

[0017] 术语“益生元衍生物”是指使用前制备的经改性形式的益生元，以增加发酵性质、可消化性或增加发酵产物如短链脂肪酸和其他代谢物。

[0018] 在一些实施方案中，益生元包含可消化和不可消化的低聚糖的一者或两者。在一些实施方案中，益生元包含至少6克的不可消化的低聚糖。在一些实施方案中，益生元包含至少、至多或约1克、2克、3克、4克、5克、6克、7克、8克、9克、10克、11克、12克、13克、14克、15克、16克、17克、18克、19克、20克、21克、22克、23克、24克、25克、30克或40克(或其中衍生的任意范围)的可消化和/或不可消化的低聚糖。如本文所用，术语“不可消化的低聚糖”是指植物中对于动物不可消化的部分。不可消化的低聚糖可以是水溶性的(可溶于水)或非水溶性的(不溶于水)。可用于本公开内容的方法和组合物的合适的不可消化的低聚糖的具体实例包括菊粉(来自菊苣或龙舌兰)、亚麻纤维、大豆纤维、燕麦纤维、玉米纤维、瓜尔豆胶、阿拉伯树胶、落叶松皮、豆胶、阿拉伯胶、南瓜纤维、奇亚纤维及其组合中的一种或多于一种。

[0019] 在一些实施方案中，低聚糖包括改性低聚糖。在一些实施方案中，改性低聚糖包括粪厌氧棒杆菌发酵的释放丁酸盐的低聚糖。释放丁酸盐是指产生代谢物丁酸盐作为发酵副产物。在一些实施方案中，低聚糖是在发酵或消化后增加胃肠道中乳酸盐的浓度、质量或量的低聚糖。实例包括小麦、黑麦、谷物/玉米、燕麦、大米和马铃薯。在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌发酵能释放丁酸盐的低聚糖包括能够被粪厌氧棒杆菌发酵成丁酸盐的化合物。

[0020] 在一些实施方案中，方法还包括施用携带丁酸基团的化合物。在一些实施方案中，携带丁酸基团的化合物包括pHPMA-b-pBMA，如WO 2018/195067中所述。在一些实施方案中，携带丁酸基团的化合物包括WO 2018/195067中公开的化合物，该文献通过引用并入本文。在一些实施方案中，携带丁酸基团的化合物是通过胃内灌胃施用的。

[0021] 在一些实施方案中，将1×10^{6}个细胞或CFU至1×10^{15}个细胞或CFU的粪厌氧棒杆菌施用给对象。在一些实施方案中，施用至少、至多或约1×10^{6}个细胞或CFU、1×10^{7}个细胞或CFU、1×10^{8}个细胞或CFU、1×10^{9}个细胞或CFU、1×10^{10}个细胞或CFU、1×10^{11}个细胞或CFU、1×10^{12}个细胞或CFU、1×10^{13}个细胞或CFU、1×10^{14}个细胞或CFU或1×10^{15}个细胞或CFU(或其中任意衍生范围)的粪厌氧棒杆菌。

[0022] 在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌、益生元和/或携带丁酸基团的化合物是同时施用的。在一些实施方案中，在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前至少1小时施用粪厌氧棒杆菌。在一些实施方案中，在施用益生元和/或携带丁酸基团的化合物之前或之后至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时或18小时或1天、2天、3天、4天、5天或6天，或1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周(或其中任意衍生的范围)施用粪厌氧棒杆菌和/或携带丁酸基团的化合物。在一些实施方案中，向对象施用至少10克的益生元。在一些实施方案中，向对象施用至少、至多或约1克、2克、3克、4克、5克、6克、7克、8克、9克、10克、11克、12克、13克、14克、15克、16克、17克、18克、19克、20克、21克、22克、23克、24克、25克、30克、40克或50克(或其中任意衍生范围)的益生元。在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌的菌落形成单位数与益生元和/或携带丁酸基团的化合物的克数的比率为1000:1至10000:1。在一些实施方案中，该比率为至少、至多或约1:1、2:1、4:1、5:1、8:1、10:1、20:1、40:1、50:1、80:1、100:1、150:1、200:1、250:1、300:1、400:1、500:1、1000:1、1500:1、2000:1、2500:1、3000:1、3500:1、4000:1、4500:1、5000:1、7500:1、10000:1、1:2、1:4、1:5、1:8、1:10、1:20、1:40、1:50、1:80、1:100、1:150、1:200、1:250、1:300、1:400、1:500、1:1000、1:1500、1:2000、1:2500、1:3000、1:3500、1:4000、1:4500、1:5000、1:7500或1:10000(或其中任意衍生范围)。在一些实施方案中，携带丁酸基团的化合物是在施用益生元之后施用的。在一些实施方案中，携带丁酸基团的化合物和益生元是在同一组合物中的。在一些实施方案中，在施用益生元之后立即或短于5分钟、10分钟、20分钟、30分钟或60分钟(或其中任意衍生范围)施用携带丁酸基团的化合物。

[0023] 在一些实施方案中，食物过敏包括牛奶过敏。在一些实施方案中，食物过敏包括花生或鸡蛋过敏。在一些实施方案中，对象已被诊断出患有食物过敏、牛奶过敏、花生过敏、鸡蛋过敏、大豆过敏、小麦/麸质过敏、贝类过敏、芝麻过敏、树坚果(开心果、腰果、核桃、杏仁、榛子、澳洲坚果)过敏、过敏性病况、自身免疫性疾病或感染。在一些实施方案中，对象先前已经被治疗过食物过敏、过敏性疾病、自身免疫性疾病或感染。在一些实施方案中，对象已经被确定对先前的治疗有抗性。在一些实施方案中，对象尚未被诊断出患有食物过敏、过敏性病况、自身免疫性疾病或感染和/或未表现出食物过敏、过敏性病况、自身免疫性疾病或感染的症状。

[0024] 在一些实施方案中，对象是人。在一些实施方案中，对象是新生儿、小于一岁、小于五岁、小于十二岁或小于十八岁。在一些实施方案中，对象小于20岁、19岁、18岁、17岁、16岁、15岁、14岁、13岁、12岁、11岁、10岁、9岁、8岁、7岁、6岁、5岁、4岁、3岁、2岁或1岁，或11月龄、10月龄、9月龄、8月龄、7月龄、6月龄、5月龄、4月龄、3月龄、2月龄或1月龄，或14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天(或其中任意衍生范围)。在具体的实施方案中，患者是儿科患者——即未满18岁。在其他实施方案中，患者是成年患者。

[0025] 在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌包括活细菌产品。在一些实施方案中，细菌被冻

干或冷冻干燥。在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌和/或益生元是口服施用的。在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌和/或益生元是在片剂或胶囊中施用的。在一些实施方案中，粪厌氧棒杆菌和/或益生元是通过本文描述的施用途径来施用的。

[0026] 术语“食物”或“食物衍生物”是指经烹煮或未煮过的可食用物品，其包含存在于整个食物中的益生元或经处理进一步分离益生元。

[0027] 在一些实施方案中，该方法还包括施用含乳酸盐的配方奶或食物。在一些实施方案中，食物是苹果、杏、牛油果、黑莓、樱桃、荔枝、油桃、桃子、梨、李子、西梅、西瓜、花椰菜和蘑菇、洋葱、朝鲜蓟、大蒜、小麦、香蕉、芦笋、菊苣、韭葱、番茄、竹笋、水果、蔬菜、牛奶、蜂蜜、小麦、黑麦、大麦、谷物或玉米、燕麦、木薯、大米和马铃薯。

[0028] 在一些实施方案中，对象被确定为保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率小于3。在一些实施方案中，保护性/非保护性操作分类单位(OTU)的比率小于、大于或约为6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1或0.5(或其中任意衍生范围)。

[0029] 在一些实施方案中，保护性OTU包括选自以下的一个或多于一个OTU：1111294、360015、新参考OTU147、628226、349024、712677、780650、843459、262095、新参考OTU166、579851、551822、298247、345540、582691、259772、325419、797229、557627、828483、299267、4448331、3376513、813217、新整理参考OTU56927、335701、191999、183865、231787、342397、581782、304641、4389289或541119，如补充表3中所述。在一些实施方案中，非保护性OTU包括选自195258、315846、551902、318190、591635、585227、370225、199354、198866、583398、583656、535375、1111191、580629、365181、359809、585914、365385、583117、180082、589071、514272、484304或589277的一个或多于一个OTU，如补充表3中所述。

[0030] 在一些实施方案中，组合物还包含药物赋形剂。在一些实施方案中，将组合物配制成用于口服施用。

[0031] 在本申请中，术语“约”用于表示值包括测量或定量方法的误差的固有变化。

[0032] 在与术语“包括”结合使用时，不使用数量词可以表示“一个”，但也与“一个或多于一个”、“至少一个”和“一个或大于一个”的含义一致。

[0033] 短语“和/或”是指“和”或“或”。为了举例说明，A、B和/或C包括：单独的A、单独的B、单独的C、A和B的组合、A和C的组合、B和C的组合、或A、B和C的组合。换句话说，“和/或”的作用是包括性的或。

[0034] 词语“包括”、“具有”、“包含”、“含有”是包括性的或开放式的，并不排除其他未记载的要素或方法步骤。

[0035] 组合物及其使用方法可以“包括”、“基本上组成为”或“组成为”整个说明书中公开的任何成分或步骤。“基本上组成为”所公开的任何成分或步骤的组合物和方法将权利要求的范围限于不实质影响所要求保护的发明的基本且新颖特性的特定材料或步骤。

[0036] 可以预期，本说明书中讨论的任何实施方案可以相对于本发明的任何方法或组合物来实现，反之亦然。此外，本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0037] 通过以下详细描述，本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而，应当理解，详细描述和具体实施例虽然说明本发明的具体实施方案，但是它们仅以举例说明的方式给出，因为从该详细描述中，在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员将变得明显。

附图说明

[0038] 以下附图构成本说明书的一部分，并且被包括在本说明书内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多于一个，结合在本说明书呈现的具体实施方案的详细描述，可以更好地理解本发明。

[0039] 图1A至图1D。健康而不是CMA的婴儿微生物群的转移防止对食物的过敏反应。(a)在无菌小鼠和由已被BLG+霍乱毒素(CT)致敏的8个供体(4个健康、4个CMA，参见补充表1)的每一个的粪便定植的小鼠中，首次用β乳球蛋白(BLG)激发后，在指定时间点核心体温的变化；n＝42个CMA、31个健康小鼠和24个GF小鼠，其中8个供体中的每一个分别有4个至12个小鼠，从两次独立实验中收集数据。(b)血清BLG特异性IgE，(c)BLG特异性IgG1和(d)来自a中小鼠的mMCPT-1。对于a，圆圈表示平均值，误差线表示平均值的标准误差。对于b至d，圆圈代表单独的小鼠，条形代表平均值+平均值的标准误差。使用线性混合效应模型对比a至d中的组，使用Benjamini-Hochberg FDR(BH-FDR)方法进行多次测试校正。*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001.

[0040] 图2A至图2F。八个人类婴儿供体的粪便样品的分析揭示了与过敏表型相关的分类学特征。(a)CMA和健康供体之间OTU丰度差异的热图。行表示以控制为0.10的错误发现率(FDR)确定是不同的，并且存在于至少4个人类粪便样品和至少两组定植小鼠中的58个OTU(参见补充表3)。列表示每个供体(D)或定植的小鼠组(m)。每个供体n＝2至3次技术重复，每个定植小鼠组n＝1至4个小鼠，在定植后2周和3周采集粪便(参见方法部分)。热图上方的条形图表示为计算的每个供体或小鼠组的潜在保护性(橙色)或非保护性(蓝色)OTU的丰度分数。(b至d)衍生自a中定植小鼠的保护性与非保护性OUT的比率(见图10B)，相对于图1中所有小鼠的BLG特异性IgE(b)、BLG特异性IgG1(c)、mMCPT-1(d)水平绘制的图谱。每个圆圈代表所有定植有四个健康(橙色)或CMA(蓝色)供体的粪便之一的小鼠的平均结果。(e)在a中样品中健康定植的小鼠(橙色)或CMA定植的小鼠(蓝色)中显著富集的分类单位的LEfSe分析(健康组中n＝8个小鼠，CMA组n＝9个小鼠，定植后2周和3周收集粪便样品)。(f)显示a中定植小鼠样品的群落组成的进化分枝图，其中通过LEfSe分析检测到的丰度不同的分类群按组着色(健康＝橙色，CMA＝蓝色)。a中的组使用离散错误发现率(DS-FDR)方法进行比较，e中采用Kruskal-Wallis检验(参见方法部分)。

[0041] 图3A至图3B。独特的回肠转录组特征区分了健康和CMA定植的小鼠。(a)定植后七天从至少2个独立实验汇总的GF(n＝3)、健康定植(n＝18)或CMA定植(n＝18)小鼠中分离的回肠IEC中的32个差异表达基因(DEG)的热图(见补充表4)。每列表示用所述供体粪便定植的各个小鼠。示出了四种类型的基因表达变化：(1)健康组中升高：相对于CMA和GF在健康小鼠中上调的基因；(2)CMA组中升高：相对于健康和GF，在CMA小鼠中上调的基因；(3)健康组中降低：相对于CMA和GF两者在健康小鼠中下调的基因；(4)CMA组中下降：相对于健康和GF，在CMA小鼠中下调的基因。(b)与a相比显著富集的、与健康定植(橙色)或CMA定植(蓝色)小鼠相关的DEG的基因属性分类(GO)术语和KEGG通路(粗体)。在b中使用超几何测试，使用Benjamini-Hochberg FDR(BH-FDR)方法进行多次测试校正(参见方法部分)。

[0042] 图4A至图4L。健康定植的小鼠回肠中回肠OTU与DEG的相关性确定了梭菌属菌种，粪厌氧棒杆菌，它防止对食物的过敏反应。(a)显示来自CMA与健康小鼠回肠IEC样品的回肠OTU的相对丰度(行)与DEG表达(列)之间的Spearman秩相关系数的热图(参见图3a和方法部

分)。(b)回肠16S数据集的OTU259772(毛螺菌科)的丰度(见补充表5)与回肠IEC中Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot12和Me1的RNA测序表达之间的Spearman相关性。圆圈代表各个小鼠,阴影带表示通过线性回归拟合的95%置信区间。(c,d)对健康和CMA定植的小鼠的回肠样品中通过16S测序确定的OTU259772(毛螺菌科)的丰度(c)和通过qPCR确定的粪厌氧棒杆菌的丰度(d)。LD表示样品低于该测试的检测限度。(e)健康和CMA定植的小鼠回肠样品中OTU259772(毛螺菌科;16S测序)的丰度与粪厌氧棒杆菌的丰度(qPCR)之间的Spearman相关性。圆圈代表各个小鼠,阴影带表示通过线性回归拟合的95%置信区间。示出了在16S和qPCR实验中均表现出高于LD的回肠样品(n=19)。(f)通过qPCR从GF小鼠以及健康和CMA定植的小鼠或由粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠中分离的回肠IEC中的Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot12和Me1的基因表达。数据归一化至Hprt为管家基因,并表示为GF的表达变化倍数,设置为1。(g)在BLG加CT致敏的CMA和粪厌氧棒杆菌单定植小鼠中首次使用BLG激发后,在指定时间点核心体温的变化。h至j,g中小鼠的血清BLG特异性IgE(h)、BLG特异性IgG1(i)和mMCPT-1(j)。k,l,CMA或粪厌氧棒杆菌定植的小鼠在激发后24小时处死并用BLG刺激72小时的脾细胞的培养上清液中的IL-13(k)和IL-4(l)。对于c、d、f和h至l,圆圈代表单个小鼠,条形代表平均值+平均值的标准误差。对于g,圆圈代表平均值,条形代表平均值的标准误差。对于a至b,每组n=18个健康定植的小鼠或n=18个CMA定植的小鼠。对于c和d,每组n=19个健康定植的小鼠或n=21个CMA定植的小鼠。对于f,每组n=14个GF,20个粪厌氧棒杆菌定植的小鼠,18个健康定植的小鼠或23个CMA定植的小鼠。对于g至j,使用两个不同的CMA供体(5和6)从三个独立实验中收集的n=16个CMA定植的小鼠和16个粪厌氧棒杆菌定植的小鼠,条形代表平均值+平均值的标准误差。对于k和l,来自一个实验的n=6个CMA定植的小鼠和9个粪厌氧棒杆菌定植的小鼠,圆圈代表单个小鼠,条形代表平均值+平均值的标准误差(s.e.e.)。使用DS-FDR方法比较c中的组,d中使用双侧学生t检验,f中使用Bonferroni多重检验校正的单因素方差分析(ANOVA),或者g中使用线性混合效应模型,以及h至l中在对数转换后使用双侧t检验。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0043] 图5。用BLG加霍乱毒素致敏的健康或CMA定植的小鼠不会导致肠道病症。对供体1(健康)和供体5(CMA,参见补充表1)激发后24小时,BLG加霍乱毒素致敏的健康或CMA定植的小鼠的组织学样品的代表性图像。如所示,所有切片均被H&E或PAS染色。比例尺=100μm。

[0044] 图6。用健康或CMA婴儿的粪便长期定植的GF小鼠不会导致肠道病症。对补充表1中所述的供体在定植后5个月至6个月收集未致敏的健康或CMA定植的小鼠的组织学样品的代表性图像。比例尺=100μm。

[0045] 图7A至图7B。健康或CMA定植小鼠的粪便样品的多样性分析。图2A的健康定植(橙色)和CMA定植的(蓝色)小鼠的粪便的(a)香农多样性指数和(b)Pielous均匀度指数。每个定植的小鼠组n=1至4个小鼠,其中在定植后第2和第3周采集粪便(见方法部分)。每个圆圈代表一个粪便样品,柱代表平均值±平均值的标准误差。补充表1描述了八种由人类配方奶喂养的粪便供体。

[0046] 图8A至图8D。健康、纯母乳喂养的婴儿微生物群的转移可防止对BLG加霍乱毒素致敏的过敏反应。(a)母乳喂养的健康或CMA婴儿供体的粪便定植的小鼠(每组n=13个小鼠,从至少两个独立实验中收集)在首次用BLG激发后,在指定时间点的核心体温变化。(b至d)a中小鼠的血清BLG特异性IgE(b)、BLG特异性IgG1(c)和mMCPT-1(d)。激发后,有四个BLG+CT

致敏的CMA定植小鼠死于过敏反应。对于a，符号代表平均值，柱代表平均值的标准误差。对于b至d，符号代表各个小鼠，条形代表平均值+平均值的标准误差。对数转换后，使用线性混合效应模型比较a中的组，b中使用双侧学生t检验。补充表2中描述了两个人类母乳喂养的粪便供体。*P<0.05。

[0047] 图9A至图9D。持续接触牛奶不会诱导喂食水或Enfamil并用BLG加霍乱毒素致敏的无菌小鼠产生BLG耐受性。(a)从三个独立的实验中收集的喂食水(n＝12)或Enfamil(n＝10)的小鼠在第一次受到BLG激发后，在指定时间点的核心体温变化。b至d，a中小鼠的血清BLG特异性IgE(b)、BLG特异性IgG1(c)和mMCPT-1(d)。对于a，圆圈表示平均值，误差条表示平均值的标准误差。对于b至d，圆圈代表单个小鼠，条形代表平均值+平均值的标准误差。对数转换后，采用线性混合效应模型比较a中的组，b至d中使用双侧学生t检验。**P＜0.01。n.s.＝不显著(P＝0.36)。

[0048] 图10A至图10B。CMA和健康供体以及定植小鼠组中保护性和非保护性OTU的二元表示。(a)CMA和健康供体中保护性/非保护性OTU的存在/不存在比率的二元图，其具有与图2a相同的布局。列表示每个供体(D)或定植的小鼠组(m)。每个供体n＝2至3次技术重复，每个定植小鼠组n＝1至4个小鼠，在定植后2周和3周采集粪便，参见方法部分。行表示在人类CMA与健康供体的比较中FDR控制在0.10、存在于至少4个人粪便样品和至少两组定植小鼠中(见补充表3)的58个OTU(参见方法部分)。网格图上方的条形图表示每个供体或小鼠组中潜在保护性(在健康供体中更多;橙色)和潜在非保护性(在CMA供体中更多;蓝色)OTU的总数。网格图表示每个样品中是(绿色)/否(白色)存在保护性和非保护性OTU。(b)在考虑到58个OTU的存在/不存在的情况下，计算a中的每个供体或小鼠组的保护性/非保护性out的比率。供体及其小鼠移植受体分别以正方形和圆圈显示。垂直虚线表示比率为2.6。

[0049] 图11。使用较大的独立的健康和CMA婴儿供体群来验证保护性/非保护性out的比率。如参考文献5所述和先前分离的健康(n＝19)和CMA(n＝19)婴儿的粪便样品中保护性/非保护性OTU的比率(见图2和图10)进行分析。水平中心线表示中位数，方框表示第25和75百分位数，须延伸到四分位差(IQR)的最大1.5倍内的最远数据点。所有单独的点都被示出，每个圆圈表示一个对象。在图2A中所示的58个OTU中，55个OTU分配有已知的参考ID，3个具有新的参考ID。新的参考OTU ID在不同的分析群体间不具有可比性，因此发明人的关注焦点是具有已知参考ID的OTU。在这55个已知的OTU中，检测该群体中的52个(29个保护性OTU和23个非保护性OTU)，并将其用于比率计算(参阅方法部分)。其他3个未检测。使用双侧Wilcoxon秩和检验。*P＜0.05。

[0050] 图12A至图12C。健康与CMA的OTU的丰度的比率在小鼠粪便和回肠样品之间显著相关。(a)气泡图显示健康和CMA定植的小鼠的粪便(在健康组中n＝8个小鼠;在CMA组中n＝9个小鼠，在定植后2周和3周收集粪便样品，与图2A相同)和回肠样品(健康组n＝22个小鼠，CMA组n＝25个小鼠)具有相似的图案。CMA和健康供体之间丰度差异显著的58个OTU以与图2A中相同的顺序显示。圆圈的大小表示相对丰度对于CMA或健康的富集程度。颜色强度表示使用DS-FDR置换检验计算的统计显著性(参见方法部分)。(b和c)小鼠粪便和回肠样品中，健康与CMA的OTU的丰度的比率显著相关。每个点代表一个单独的OTU。对于b，对于每个OTU，其平均丰度在8个健康定植和9个CMA定植的小鼠的粪便样品和在22个健康定植和25个CMA定植的小鼠的回肠样品中以组水平计算。粪便的OTU丰度的比率绘制在x轴上，回肠的OTU丰

度的比率绘制在y轴上。对于c，使用至少两次独立实验中汇总的n＝35个(15个健康定植的小鼠和20个CMA定植的小鼠)计算粪便和回肠OTU丰度的比率，其中粪便和回肠样品是从同一小鼠收集的。有关更多详细信息，参见方法部分。

[0051] 图13A至图13C。在健康和CMA定植的小鼠的粪便样品中，OTU259772(毛螺菌科)和粪厌氧棒杆菌的丰度相关。在图2的健康定植的(n＝7)和CMA定植的(n＝8)小鼠的粪便样品中16S数据集的OTU259772(毛螺菌科)的丰度(a)和通过qPCR获得的粪厌氧棒杆菌的丰度(b)。对于每只小鼠，在定植后2周和3周收集1个至2个粪便样品。LD表示样品低于测定的检测限。(c)图2的健康和CMA定植的小鼠的粪便样品中OTU259772(毛螺菌科，16S测序)的丰度与粪厌氧棒杆菌的丰度(qPCR)之间的Spearman相关性。在16S和qPCR实验中均高于LD的粪便样品已示出(n＝13)。每个圆圈代表一个粪便样品。对于a和b，条形表示平均值+平均值的标准误差，对于c，阴影带表示通过线性回归拟合的95％置信区间。使用DS-FDR方法比较a中的组，b中使用双侧学生t检验。***P＜0.001。

[0052] 图14。回肠样品中粪厌氧棒杆菌的丰度与回肠IEC中的基因表达相关。通过qPCR获得的的粪厌氧棒杆菌的丰度与回肠IEC中Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot12和Me1的RNA测序表达之间的Spearman相关性(见图3A)。圆圈表示单个小鼠，阴影带表示通过线性回归拟合的95％置信区间。n＝36个小鼠(18个健康小鼠和18个CMA定植小鼠)，从至少两个独立的实验中收集。图中显示了检测值高于检测限的样品(粪厌氧棒杆菌丰度>0)。

[0053] 图15。显示了粪厌氧棒杆菌的分离和表征方案。

[0054] 图16。A.caccae_lah(粪厌氧棒杆菌_lah)对氨苄青霉素高度敏感。它对四环素稍微敏感。

[0055] 图17。A.caccae_lah不能在单一培养基发酵复杂的糖类，但可以发酵如婴儿配方奶中的简单糖，包括乳糖。A.caccae_lah来自冷冻储液在CMG液体培养基中生长24小时，然后将10ul转移到补充有10mg/ml糖类的最小的蛋白胨酵母(PY)液体培养基中。48小时后测量生长和丁酸盐产量。所有实验均一式两份，并通过单因素方差分析对组进行分析。与单独PY相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.0001。

[0056] 图18。A.caccae_lah能够同时使用乳酸盐和乙酸盐生产丁酸盐。A.caccae_lah来自冷冻的甘油储液在CMG液体培养基中培养24小时，然后将10μl转移到补充有33mM乙酸盐和/或40mM乳酸盐的最小的PY液体培养基中。48小时后测量生长和丁酸盐产量。所有实验均一式两份，并通过单因素方差分析对组进行分析。与单独PY相比，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.0001。

[0057] 图19。与来自过敏(CMA)婴儿供体的复杂细菌混合物共培养时，A.caccae_lah从纤维中产生的丁酸盐明显更多。A.caccae_lah或人CMA粪便样品来自冷冻甘油储液中在CMG液体培养基中分别生长24小时，然后将总量10μl转移至补充有10mg/ml马铃薯淀粉或纤维二糖的最小的PY液体培养基中。48小时后测量生长和丁酸盐产量。所有实验一式两份。

[0058] 图20A至图20B。来自CMA储存库小鼠粪便中的细菌混合物在基线时比来自冷冻甘油储液的人CMA粪便产生更多的丁酸盐(A)，但是添加带有乳酸盐和乙酸盐的A.caccae_lah仍导致丁酸盐水平显著不同(B)。衍生自人或小鼠粪便中的A.caccae_lah或CMA混合物来自冷冻甘油储液在CMG液体培养基中分别生长24小时，然后将总量10μl转移到补充有10mg/ml糖类的最小的PY液体培养基。在24小时后的组中，在时间＝0时转移CMA，在时间＝24小时时

转移A.caccae_lah和糖类。在48小时或72小时后测量生长和丁酸盐产量。所有实验一式两份。

[0059] 图21描绘了确定A.caccae_lah定植到CMA定植的小鼠中以及对益生元补充剂的依赖性的实验设计。

具体实施方式

[0060] 为了更好地理解微生物群在调节人类过敏性疾病中的作用,发明人用衍生自健康婴儿或牛奶过敏性(CMA)婴儿粪便的细菌定植无菌(GF)小鼠。发明人在此表明,用健康婴儿的细菌定植无菌小鼠可防止其对牛奶的过敏原β-乳球蛋白过敏。用来自CMA婴儿的细菌定植的小鼠表现出对BLG激发的过敏反应,并显著增加了血清BLG特异性IgE。细菌组成的差异将人类供体和定植小鼠中的健康群体和CMA群体分开。回肠肠上皮细胞的RNA测序分析揭示了差异表达基因(DEG),以区分所有供体中健康和CMA定植的小鼠。在健康定植的小鼠回肠中回肠OTU与DEG的相关性确定了一种梭菌属的种,粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae),其可防止对食物的过敏反应。研究结果表明,肠道菌群的组成对于调节对饮食抗原的过敏反应较关键,并启示调节细菌群落的干预措施可能对食物过敏有治疗意义。

[0061] 一、定义

[0062] 术语“单位剂量”或“剂量”是指适用于对象的物理学上离散的单位,每个单位包含经计算的预定量的治疗组合物,以产生本文所讨论的与其施用有关的期望反应,即与适当的途径和治疗方案有关的期望反应。根据治疗次数和单位剂量的施用量取决于预期的效果。本实施方案的组合物施用于患者或对象的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,例如对象的体重、年龄、健康状况和性别、所治疗疾病的类型、疾病渗透程度、既往或同时发生的治疗干预措施、患者的特发性疾病、施用途径以及特定治疗物质的效力、稳定性和毒性。例如,每次施用的剂量还可以包括约1μg/kg/体重至约1000mg/kg/体重(该范围包括中间剂量)或大于1000mg/kg/体重,以及其中衍生的任何特定剂量。在可从本文所列数字得出的范围的非限制性实例中,可以按约5μg/kg/体重至约100mg/kg/体重、约5μg/kg/体重至约500mg/kg/体重的范围等施用。无论如何,负责给药的医师将确定组合物中活性成分的浓度和用于个体对象的合适剂量。

[0063] “对象”和“患者”是指人类或非人类,例如灵长类、哺乳动物和脊椎动物。在特定的实施方案中,对象是人类。

[0064] 如本文所用,术语“治疗”、“治疗方法”、“处理”或“改善”在用于提及疾病、病症或医疗状况时,是指针对病症的治疗性治疗,其中目的是逆转、减轻、改善、抑制、减慢或停止症状或病症的发展或严重度。术语“治疗”包括减少或减轻病症的至少一种不良反应或症状。如果一种或多于一种症状或临床指标被减轻,治疗一般是“有效的”。或者,如果疾病的进展减慢或停止,则治疗是“有效的”。即,“治疗”不仅包括症状或指标的改善,而且包括停止或至少减慢在缺乏治疗时可能产生的症状的进展或恶化。与没有治疗预期的情况相比,有益的或希望的临床结果包括但不限于一种或多于一种症状的减轻、缺陷程度减轻以及寿命的延长。

[0065] 术语“分离”包括细菌或其他实体或物质(1)在最初产生时(无论是自然产生还是在实验环境中)已与与其相关的至少一些组分分离,和/或(2)由人工产生、制备、纯化和/或

制造。分离的细菌可以与至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或多于90％的最初与它们相关联的其他组分分离。在一些实施方案中，分离的细菌是大于约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或大于约99％纯的。如本文所用，如果其基本上不含其他成分，则该物质是“纯的”。

[0066] 术语“纯化”、“提纯”和“纯化的”指细菌或其他材料在最初产生或生成时(例如无论是自然产生还是在实验环境中)或在最初产生后的任何时间和与其相关的至少一些组分分离。如果细菌或细菌群体是在产生时或产生后分离的，例如从包含细菌或细菌群体的材料或环境中分离的，则可以认为是纯化的，而纯化的细菌或细菌群体可以包含至多约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或大于约90％的其他材料，并且仍被视为“分离的”。在一些实施方案中，纯化的细菌和细菌群体是大于约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或大于约99％纯的。在本文提供的细菌组合物的情况下，组合物中存在的一种或多于一种细菌类型可以单独从包含该细菌类型的材料或环境中产生和/或存在的一种或多于一种其他细菌中纯化。细菌组合物及其细菌成分一般从残栖产物中纯化。

[0067] 如本文中所用的，术语“包括”或“包含”提及对本发明是必须的组合物、方法及其各自组分使用，但可以包括未指明的要素，无论其是否是必须的。

[0068] 如本文所用，术语“基本上组成为”是指给定实施方案所需的那些要素。该术语允许存在不会实质影响本发明实施方案的基本和新颖的或功能性的特征的其他要素。关于药物组合物，术语“基本上组成为”包括所列举的活性成分，排除任何其他活性成分，但不排除任何药物赋形剂或其他不具有治疗活性的组分。

[0069] 术语“组成为”是指本文所述的组合物、方法及其各自组分，不包括在该实施方案的描述中未列举的任何要素。

[0070] 如本说明书和所附权利要求书中所用的，不使用数量词包括复数，除非上下文另外明确指出。因此，例如提及“方法”，包括本文所描述类型的一种或多于一种方法和/或步骤，和/或那些在本领域技术人员阅读本公开内容等之后将变得显而易见的那些。

[0071] 如本文所用，就指定组分而言，“基本上不含”在本文中是指没有将指定的组分有意配制到组合物中和/或其仅作为杂质或以痕量存在。因此，由组合物的任何意外污染而导致的指定组分的总量远低于0.01％。最优选地，组合物中用标准分析方法不能检测到任何量的指定组分。

[0072] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是相互排斥的，否则在权利要求中使用术语“或”来表示“和/或”，尽管本公开内容支持仅指替代方案以及“和/或”的定义。如本文所用，术语“另一”可以表示至少第二或更多。

[0073] 在整个本申请中，术语“约”用来表示值包括设备、用于确定该数值的方法或研究对象之间存在的差异的固有误差变化。

[0074] 短语“有效量”或“治疗有效量”或“足够量”是指足以产生期望结果的药物或试剂的剂量。

[0075] II.微生物组合物

[0076] 本公开内容的实施方案涉及用于治疗传染性疾病、自身免疫性疾病或过敏性疾病

的微生物组合物。

[0077] 本公开内容还提供了包含一种或多于一种如上所述的微生物培养物的药物组合物。因此，细菌物种以活菌存在于剂型中，无论是干燥形式还是冻干形式。这可以优选适应合适的施用，例如以片剂或散剂形式，可以带有肠溶衣，用于口服治疗。

[0078] 在具体方面，组合物配制成用于口服施用。口服施用可以通过使用可咀嚼制剂、溶解制剂、包囊/包衣制剂、多层锭剂(以分离活性成分和/或活性成分和赋形剂)、缓释/延时释放制剂或本领域技术人员已知的其他合适制剂来实现。尽管本文使用词语“片剂”，但是该制剂可以采取通常可由其他术语指代的各种物理形式，例如锭剂、丸剂、胶囊等。

[0079] 尽管本公开内容的组合物优选配制成用于口服施用，但是可以采用其他施用途径，包括但不限于皮下、肌内、皮内、经皮、眼内、腹膜内、粘膜、阴道、直肠和静脉内。

[0080] 本公开内容的组合物的期望剂量可以在一天、一周、一个月或一年中以适当间隔以多个(例如两个、三个、四个、五个、六个或多于六个)亚剂量施用。

[0081] 一方面，所公开的组合物可以制备成胶囊。胶囊(即载体)可以是中空的，一般为圆柱状的，由各种物质如明胶、纤维素、糖类等形成。

[0082] 另一方面，所公开的组合物可以制备成栓剂。栓剂可包括但不限于细菌和一种或多于一种载体，例如聚乙二醇、阿拉伯胶、乙酰化单甘油酯、巴西棕榈蜡、乙酸邻苯二甲酸纤维素、玉米淀粉、邻苯二甲酸二丁酯、多库酯钠、明胶、甘油、氧化铁、高岭土、乳糖、硬脂酸镁、对羟基苯甲酸甲酯、药用釉料、聚维酮、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠、脱水山梨糖醇单油酸酯、蔗糖、滑石粉、二氧化钛、白蜡和着色剂。

[0083] 在一些方面，所公开的微生物组合物可以制备成片剂。片剂可以包括细菌和一种或多于一种压片剂(即载体)，例如磷酸氢钙、硬脂酸、交联羧甲基纤维素、二氧化硅、纤维素和纤维素包衣。可以使用直接压片方法来形成片剂，但是本领域技术人员将理解，可以使用各种技术来形成片剂。

[0084] 在其他方面，所公开的微生物组合物可以形成为食物或饮料，或者可替代地，形成为食物或饮料的添加剂，其中将适量的细菌添加到食物或饮料中以使食物或饮料成为载体。

[0085] 在一些实施方案中，微生物组合物还可以包括有效刺激存在于对象的胃肠道中的粪厌氧棒杆菌生长的食物或营养补充剂。在一些实施方案中，营养补充剂由另一与健康的人肠道微生物组相关的细菌产生。

[0086] III.治疗组合物的施用

[0087] 本文提供的疗法包括施用治疗剂的组合，例如微生物组合物和益生元的组合。疗法可以以本领域已知的任何合适方式施用。例如，微生物组合物和益生元可以依次(在不同的时间)或同时(在相同的时间)施用。在一些实施方案中，微生物组合物和益生元在分开的组合物中。在一些实施方案中，微生物组合物和益生元在同一组合物中。

[0088] 本公开内容的实施方案涉及包含细菌和一种或多于一种益生元的组合物和方法。细菌和/或益生元可以在一种组合物或多于一种组合物中施用，例如2种组合物、3种组合物或4种组合物。可以采用试剂的各种组合，例如细菌(或包含细菌的组合物)为“A”，益生元为“B”：

[0089] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0090] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0091] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0092] 在一些实施方案中，微生物组合物是在益生元之前施用的。在一些实施方案中，微生物组合物在益生元之前的至少、至多或约1小时、2小时、3小时、5小时、6小时、12小时、24小时或2天、3天、4天、6天、8天、10天或2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周(或其中任意衍生范围)施用。在一些实施方案中，至少1次、2次、3次、4次、5次、6次或7次(或其中任意衍生范围)剂量的微生物组合物在益生元之前的至少、至多或约1小时、2小时、3小时、5小时、6小时、12小时、24小时或2天、3天、4天、6天、8天、10天或2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周(或其中任意衍生范围)施用。在一些实施方案中，微生物组合物是在益生元之后施用的。在一些实施方案中，微生物组合物在益生元之后或在至少一种益生元之后或至少2种益生元之后的至少、至多或约1小时、2小时、3小时、5小时、6小时、12小时、24小时或2天、3天、4天、6天、8天、10天或2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周(或其中任意衍生范围)施用。在一些实施方案中，至少1次、2次、3次、4次、5次、6次或7次(或其中任意衍生范围)剂量的微生物组合物在益生元后或在至少一种益生元或至少2种益生元之后至少、至多或约1小时、2小时、3小时、5小时、6小时、12小时、24小时或2天、3天、4天、6天、8天、10天或2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周(或其中任意衍生范围)施用。

[0093] 在一些实施方案中，微生物调节剂组合物配制成用于口服施用。本领域技术人员已知多种配方，其可以包含活的或灭活的微生物，并且可以作为食物补充剂(如丸剂、片剂等)或作为功能食物如饮料或发酵酸奶存在。

[0094] 本公开内容的试剂可以通过相同的施用途径或不同的施用途径来施用。在一些实施方案中，益生元通过静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室/脑室内或鼻内施用。在一些实施方案中，微生物组合物通过静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室/脑室内或鼻内施用。合适剂量可以基于要治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、个体的临床状况、个体的临床病史和对治疗的反应以及主治医师的判断来确定。

[0095] 例如，实施方案中微生物调节剂组合物的至少一种分离或纯化的细菌群体或至少2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种、11种、12种、13种、14种或15种分离或纯化的细菌群体中的每一种施用给人的治疗有效量或足够量为至少约1×10^{3}个菌落形成单位(CFU)的细菌或至少约1×10^{4}CFU、1×10^{5}CFU、1×10^{6}CFU、1×10^{7}CFU、1×10^{8}CFU、1×10^{9}CFU、1×10^{10}CFU、1×10^{11}CFU、1×10^{12}CFU、1×10^{3}CFU、1×10^{14}CFU、1×10^{15}CFU或多于1×10^{15}CFU(或其中任意衍生范围)的细菌。在一些实施方案中，单次剂量包含以至少、至多或约1×10^{4}CFU、1×10^{5}CFU、1×10^{6}CFU、1×10^{7}CFU、1×10^{8}CFU、1×10^{9}CFU、1×10^{10}CFU、1×10^{11}CFU、1×10^{12}CFU、1×10^{13}CFU、1×10^{14}CFU、1×10^{15}CFU或多于1×10^{15}CFU(或其中任意衍生范围)的量存在的细菌(例如本文描述的特定细菌或种、属或科)。在一些实施方案中，单次剂量包含至少、至多或大约1×10^{4}CFU、1×10^{5}CFU、1×10^{6}CFU、1×10^{7}CFU、1×10^{8}CFU、1×10^{9}CFU、1×10^{10}CFU、1×10^{11}CFU、1×10^{12}CFU、1×10^{13}CFU、1×10^{14}CFU、1×10^{15}CFU或大于1×10^{15}CFU(或其中任意可衍生范围)的总细菌。

[0096] 在一些实施方案中，实施方案中微生物组合物的至少一种分离或纯化的细菌群体中的每一种施用于人的治疗有效量或足够量为至少约1×10^{3}个细菌细胞或至少约1×10^{4}

个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{10}个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个、1×10^{15}个细胞(或其中任意衍生范围)。在一些实施方案中,单次剂量包含以至少、至多或约1×10^4个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个、1×10^{15}个或多于1×10^{15}个细胞(或其中任意衍生范围)的量存在的细菌(例如本文所述的特定细菌或种、属或科)。在一些实施方案中,单次剂量包含至少、至多或约1×10^4个、1×10^5个、1×10^6个、1×10^7个、1×10^8个、1×10^9个、1×10^{11}个、1×10^{12}个、1×10^{13}个、1×10^{14}个、1×10^{15}个或大于1×10^{15}细胞(或其中任意衍生范围)的总细菌。

[0097] 治疗可以包括各种“单位剂量”。单位剂量定义为包含预定量的治疗组合物。所施用的量、具体的途径和制剂都在临床领域的技术人员的确定范围内。单位剂量不必在单次注射中施用,而可以包括在设定的时间段内连续输注。在一些实施方案中,单位剂量包括单次可施用剂量。

[0098] 根据治疗次数和单位剂量,施用量取决于预期的治疗效果。有效量应理解为是指达到特定效果所需的量。在某些实施方案的实施中,预期10mg/kg至200mg/kg的剂量可影响这些试剂的保护能力。因此,可以预期,剂量包括约0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85,90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195和200、300、400、500、1000μg/kg、mg/kg、μg/天或mg/天或其中任意衍生范围的剂量。此外,这样的剂量可以在一天中多次施用,和/或在数天、数周或数月内施用。

[0099] 在某些实施方案中,药物组合物的有效量是可以提供约1μM至150μM的血液浓度的剂量。在另一实施方案中,有效量提供约4μM至100μM、或约1μM至100μM、或约1μM到50μM、或约1μM到40μM、或约1μM到30μM、或约1μM到20μM、或约1μM到10μM、或约10μM至150μM、或约10μM至100μM、或约10μM至50μM、或约25μM至150μM、或约25μM至100μM、或约25μM至50μM、或约50μM至150μM、或约50μM至100μM(或其中任意衍生范围)的血液浓度。在其他实施方案中,该剂量可以提供由给对象施用治疗剂引起的以下药剂的血液浓度:约、至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100μM或mM或其中任意衍生的范围。在某些实施方案中,给对象施用的治疗剂在体内被代谢为经代谢的治疗剂,这种情况下血液浓度可以指经代谢的治疗剂的量。或者,在治疗剂不被对象代谢的情况下,本文讨论的血液浓度可以指未代谢的治疗剂。

[0100] 治疗组合物的精确量还取决于医师的判断,并且是每个个体特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(缓解症状还是治愈症状)以及对象的特定治疗物质或可能正在接受的其他疗法的效力、稳定性和毒性。

[0101] 本领域技术人员将理解并意识到,可以将μg/kg或mg/kg体重的剂量单位转换并以类似的浓度单位μg/ml或μM或mM的(血液浓度)表示,例如4μM至100μM。还应理解,摄取是依赖物种和器官/组织的。有关摄取和浓度测量的适用转换因子和生理学假设是众所周知的,允许本领域技术人员将一种浓度测量转换为另一种,并且对本文所述的剂量、功效和结果

做出合理的比较和结论。

[0102] 益生元可以利用本领域已知的药物配制技术来配制。其可以利用已知的用于递送至胃肠道特定区域的专门技术来配制。PCT申请公开文本WO 2018/195067 A1和美国专利申请US15/257673中公开了两个本领域已知的实例，二者均通过引用并入本文。益生元或益生元和粪厌氧棒杆菌组合的其他制剂是本领域已知的。在一些实施方案中，本公开内容的组合物包含例如如WO 2018/195067中所述的携带丁酸基团的化合物。

[0103] IV.治疗方法

[0104] 本公开内容的方法涉及传染性、自身免疫性或过敏性疾病的治疗。在一些实施方案中，该方法用于治疗食物过敏。在一些实施方案中，食物过敏包括奶过敏。在某些实施例中，奶过敏包括牛奶过敏。在一些实施方案中，奶过敏包括牛奶、山羊奶或绵羊奶过敏。在一些实施方案中，该方法用于治疗过敏、哮喘、糖尿病(例如1型糖尿病)、移植排异、关节炎(类风湿关节炎例如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风或痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、急性免疫性关节炎、慢性炎症性关节炎、变性关节炎、II型胶原诱导性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、斯蒂尔病、椎骨关节炎和全身型幼年类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、慢性原发性多发性关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎症性过度增生性皮肤病、银屑病如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病、特应性反应包括特应性疾病如花粉症和乔布氏综合症、皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、剥脱性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎、钱币状皮炎、脂溢性皮炎、非特异性皮炎、原发性刺激性接触皮炎和特应性皮炎、x-连锁性高IgM综合征、过敏性眼内炎性疾病、荨麻疹例如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹，包括慢性自身免疫性荨麻疹、肌炎、多发性肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化症如全身性硬化症、多发性硬化症(MS)如脊髓-视神经MS、原发性进行性MS(PPMS)和复发性消退性MS(RRMS)、进行性全身性硬化症、动脉粥样硬化症、动脉硬化症、弥散性硬化症(sclerosis disseminata)、共济失调性硬化、视神经脊髓炎(NMO)、炎症性肠病(IBD)(例如克罗恩病、自身免疫介导的胃肠道疾病、结肠炎如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)、溃疡性结肠炎(colitis ulcerosa)、微观结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎、以及自身免疫性炎性肠病)、炎症性肠炎、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化性胆管炎、呼吸窘迫综合征，包括成人或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、脑膜炎、全部或部分葡萄膜的炎症、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫性血液病、类风湿性脊柱炎、类风湿性滑膜炎、遗传性血管性水肿、脑神经损伤(如脑膜炎)、妊娠疱疹、妊娠性类天疱疮、阴囊瘙痒、自身免疫性卵巢早衰、由于自身免疫性疾病导致的突发性听力丧失、IgE介导的疾病如过敏反应和过敏性和特应性鼻炎、脑炎如拉斯默森氏(Rasmussen's)脑炎和边缘和/或脑干脑炎、葡萄膜炎，如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎、患有或不患有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)，如慢性或急性肾小球肾炎如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、I型和II型的膜增生性或膜增殖性GN(MPGN)、以及急进性GN、增生性肾炎、自身免疫性多腺内分泌衰竭、阴茎头炎包括浆细胞性局限性阴茎头炎、阴茎头包皮炎、离心性环形红斑、持久性色素异常性红斑、多形红斑、环形肉芽肿、光泽苔藓、硬化萎缩性苔藓、慢性单纯性苔藓、小棘苔

藓、扁平苔藓、片层状鱼鳞病、表皮松解性角化过度病、癌前期角化病、坏疽性脓皮病、过敏性病症和反应、过敏反应、湿疹包括过敏性或特应性湿疹、干性湿疹、出汗障碍性湿疹和掌跖部急性湿疹(vesicular palmoplantar eczema)、哮喘如支气管哮喘、支气管性哮喘和自身免疫性哮喘、涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的疾病、针对外来抗原如妊娠期间胎儿A-B-O血型的免疫反应、慢性肺炎性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞黏附缺陷症、狼疮,包括狼疮性肾炎、狼疮性脑炎、小儿狼疮、非肾性狼疮、肾外性狼疮、盘状狼疮和盘状红斑狼疮、脱发性狼疮、系统性红斑狼疮(SLE)如皮肤SLE或亚急性皮肤SLE、新生儿狼疮综合征(NLE)和播散性红斑狼疮、幼发型(I型)糖尿病包括小儿胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和成年发病型糖尿病(II型糖尿病)和自身免疫糖尿病。还考虑与由细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应有关的免疫反应、结节病、肉芽肿病包括淋巴瘤肉芽肿、韦格纳肉芽肿病、粒细胞缺乏症、血管炎病包括血管炎、大血管血管炎(包括风湿性多肌痛症和巨细胞高安氏(Takayasu's)动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病和结节性多发性动脉炎/结节性动脉周围炎)、显微型多发性动脉炎、免疫性血管炎、中枢神经系统血管炎、皮肤性血管炎、超敏性血管炎、坏死性血管炎如全身性坏死性血管炎和ANCA相关性血管炎如变应性肉芽肿性(Churg-Strauss)血管炎或综合征(CSS)和ANCA相关性小血管性血管炎、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、Coombs阳性贫血、戴-布二氏贫血、溶血性贫血或免疫溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、艾迪生病、自身免疫性中性粒细胞减少症、全血细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞透析的疾病、中枢神经系统炎性疾病、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、多器官损伤综合症如继发于败血病、创伤或出血的多器官损伤综合症、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、抗磷脂抗体综合征、过敏性神经炎、白塞病/综合征、Castleman综合征、Goodpasture综合征、Reynaud综合征、Sjogren综合征、Stevens-Johnson综合征、类天疱疮如大疱性天疱疮和皮肤天疱疮、天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、粘膜类天疱疮型天疱疮和红斑天疱疮)、自身免疫性多发性内分泌腺病、莱特尔氏病或综合征、热损伤、先兆子痫、免疫复合物疾病如免疫复合物肾炎、抗体介导的肾炎、多发性神经病、慢性神经病如IgM多发性神经病或IgM介导的神经病、自身免疫或免疫介导的血小板减少症如特发性血小板减少性紫癜(ITP)包括慢性或急性ITP、巩膜炎如特发性角膜巩膜炎、巩膜外层炎、睾丸和卵巢的自身免疫性疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退、自身免疫内分泌疾病包括甲状腺炎如自身免疫性甲状腺炎、桥本氏病、慢性甲状腺炎(桥本氏甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、特发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯病、多腺综合征如自身免疫性多腺综合征(或多腺内分泌病综合征)、副肿瘤综合征包括神经系统副肿瘤综合征如Lambert-Eaton肌无力综合征或Eaton-Lambert综合征、僵人综合征、脑脊髓炎如过敏性脑脊髓炎或变应性脑脊髓炎和实验性变应性脑脊髓炎(EAE)、实验性自身免疫性脑脊髓炎、重症肌无力如胸腺瘤相关的重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、视性眼阵挛或视阵挛肌阵挛综合征(OMS)、和感觉神经病、多灶性运动神经病、席汉氏综合症、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、狼疮样肝炎、巨细胞性肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎、淋巴样间质性肺炎(LIP)、闭塞性细支气管炎(非移植)伴NSIP、格林-巴利综合征(感染性多发性神经根炎)、伯杰氏病(IgA肾病)、特发性IgA肾病、线状IgA皮肤病、急性发热性嗜中性皮肤病、角层下脓疱性皮肤病、短暂性棘皮松解性皮肤病、肝硬化如原发性胆汁性肝硬化和肺硬变、自身免疫性

肠病综合征、腹腔疾病或乳糜泻、口炎性腹泻(麸质肠病变)、顽固性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷沉球蛋白血症、肌萎缩性侧索硬化症(ALS;卢伽雷氏病)、冠状动脉疾病、自身免疫性耳部疾病如自身免疫性内耳疾病(AIED)、自身免疫性听力损失、多发性软骨炎如顽固性或复发的或复发性多发性软骨炎、肺泡蛋白沉着症、科根综合症/非梅毒间质性角膜炎、贝尔氏麻痹、斯威特氏病/综合症、酒渣鼻自身免疫性疾病、带状疱疹相关性疼痛、淀粉样变性、非癌性淋巴细胞增多症、原发性淋巴细胞增多症,包括单克隆B细胞淋巴细胞增多症(如良性单克隆丙种球蛋白病和意义未定的单克隆丙种球蛋白病,MGUS)、周围神经病变、副肿瘤综合症、通道病如癫痫、偏头痛、心律不齐、肌肉疾病、耳聋、失明、周期性麻痹和中枢神经系统的通道病变、自闭症、炎性肌病、局灶性或节段性或局灶性节段性肾小球硬化症(FSGS)、内分泌眼病变、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性肝病、纤维肌痛、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘疾病如自身免疫性脱髓鞘疾病和慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、德雷斯勒(Dressler)综合征、大秃头症(alopecia greata)、全秃头症(alopecia totalis)、肢端硬皮综合征(钙质沉着、雷诺现象、食道动力障碍、硬化、和毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不育如由于抗精子抗体、混合性结缔组织病、恰加斯氏病、风湿热、复发性流产、农民肺、多形性红斑、心脏切开术后综合征、库兴氏综合症、爱鸟者肺、变应性肉芽肿性血管炎、良性淋巴细胞性血管炎、阿尔波特综合征、肺泡炎如变应性肺泡炎和纤维性肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、寄生虫病如利什曼病、锥虫病、血吸虫病、蛔虫病、曲霉菌病、Sampter's综合征、卡普兰氏综合征、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、弥漫性间质性肺纤维化、间质性肺纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多病、嗜酸性筋膜炎、舒尔曼氏综合症、费耳蒂氏综合症、丝虫病、睫状体炎如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎(急性或慢性)、或Fuch睫状体炎、亨-舍二氏紫癜、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染、SCID、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、埃可病毒感染、败血症、内毒素血症、胰腺炎、甲状腺功能亢进症(thyroxicosis)、细小病毒感染、风疹病毒感染、疫苗接种后综合症、先天性风疹感染、EB病毒感染、流行性腮腺炎、伊文氏综合症、自身免疫性腺衰竭、西登哈姆氏舞蹈病、链球菌感染后肾炎、血栓闭塞性脉管炎、甲状腺毒症、脊髓痨、脉络膜炎、巨细胞多肌痛、慢性超敏性肺炎、干燥性角结膜炎、流行性角结膜炎、原发性肾病综合征、微小病变性肾病、良性家族性和缺血性再灌注损伤、移植器官再灌注、视网膜自身免疫病、关节炎症、支气管炎、慢性阻塞性呼吸道/肺部疾病、矽肺病、口疮、口疮性口炎、动脉硬化性疾病、无精子产生症、自身免疫溶血、伯克氏病、冷沉球蛋白血症、杜普伊特伦挛缩症、晶状体过敏性眼内炎、过敏性肠炎、麻风性结节红斑、特发性面神经麻痹、慢性疲劳综合症、风湿性发热、哈曼-里希氏病、感音神经性听力丧失、阵发性血红蛋白尿、性腺机能减退、局部回肠炎、白细胞减少症、传染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发性特发性黏液水肿、肾病、交感性眼炎、肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎、急性多发性神经根炎、坏疽性脓皮病、亚急性(Quervain's)甲状腺炎、获得性脾萎缩、非恶性胸腺瘤、白癜风、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及T细胞浸润的疾病、白细胞黏附缺陷症、与细胞因子和T淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应有关的免疫反应、涉及白细胞渗出的疾病、多器官损伤综合症、抗原-抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜疾病、过敏性神经炎、自身免疫性多发性内分泌腺病、卵巢炎、原发性粘液水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合性结缔组织

病、肾病综合征、胰岛炎、多发性内分泌腺衰竭、I型自身免疫性多腺综合征、成人特发性甲状旁腺功能减退(AOIH)、心肌病如扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症(EBA)、血色素沉着症、心肌炎、肾病综合征、原发性硬化性胆管炎、化脓性或非化脓性鼻窦炎、急性或慢性鼻窦炎、筛窦炎、额窦炎、上颌窦炎或蝶窦炎、嗜酸性粒细胞相关疾病如嗜酸性粒细胞增多、肺嗜酸性粒细胞增多浸润症、嗜酸性粒细胞增多-肌痛综合征、吕弗勒氏综合症、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、热带肺嗜酸性粒细胞增多症、支气管肺曲霉病、肺曲霉球或含有嗜酸性粒细胞的肉芽肿、过敏反应、血清阴性脊柱关节病、多内分泌自身免疫性疾病、硬化性胆管炎、巩膜、巩膜外层、慢性黏膜皮肤念珠菌病、布鲁顿氏综合征、婴儿一过性低丙种球蛋白血症、维斯科特-奥尔德里奇综合征、共济失调毛细血管扩张综合征、血管扩张、与胶原蛋白疾病相关的自身免疫性疾病、风湿病、神经系统疾病、淋巴结炎、血压反应降低、血管功能障碍、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、肾缺血、脑缺血以及伴随血管生成的疾病、过敏性超敏性疾病、肾小球性肾炎、再灌注损伤、缺血再灌注障碍、心肌或其他组织的再灌注损伤、淋巴瘤性气管支气管炎、炎性皮肤病、具有急性炎性成分的皮肤病、多器官衰竭、大疱性疾病、肾皮质坏死、急性化脓性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性疾病、眼和眼眶炎性疾病、粒细胞输血相关综合征、细胞因子介导的毒性、发作性睡病、急性严重炎症、慢性顽固性炎症、肾盂炎、动脉内膜增生、消化性溃疡、心瓣膜炎、移植物抗宿主病、接触性超敏反应、哮喘气道反应过度和子宫内膜异位。

[0105] V.试剂盒

[0106] 本公开内容的某些方面还包括用于执行本公开内容的方法的试剂盒，例如包含本文所述组合物的试剂盒。试剂盒可包括带有标签的容器。合适的容器包括例如瓶、小瓶和试管。容器可以由多种材料形成，例如玻璃或塑料。容器可容纳包括用于预后或非预后应用的探针的例如如上所述的组合物。容器上的标签可以指示该组合物用于特定的预后或非预后应用，并且还可以指示用于体内或体外使用，例如如上所述的。试剂盒可包括上述容器和一个或多个其他容器，其中包含从商业和用户角度需要的材料，包括缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明的包装插页。

[0107] VI.实施例

[0108] 包括的以下实施例用来说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解，以下实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实施中作用较好的技术，因此可视为构成本发明实施的优选方式。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应当理解，可以在所公开的具体实施方案中进行许多改变，并且在不脱离本发明精神和范围的情况下仍可获得相似或类似的结果。

[0109] 实施例1——健康婴儿带有防止食物过敏的肠道细菌

[0110] B.结果

[0111] 发明人实验室和其他人的工作表明，患有CMA的婴儿的粪便微生物群落与健康婴儿的显著不同(5,6)。基于这些结果以及微生物群落成员可预防过敏的证据(7)，发明人使用了悉生小鼠模型来调查共生细菌在预防对牛奶过敏原β-乳球蛋白(BLG)的过敏反应中是否起因果作用。将无菌(GF)小鼠定植来自四名健康婴儿供体和四名IgE介导的牛奶过敏(CMA)婴儿供体的人粪便，这些供体的年龄、性别和出生方式相匹配(8、9)(补充表1)。之前已报道饮食对于用人类粪便稳定定植无菌小鼠很重要(参考文献10)。为了支持人类细菌在

鼠宿主中的生长，小鼠接受来自配方奶喂养的健康婴儿或CMA婴儿的粪便，并且除了植物性小鼠食物外，还被喂养与人类婴儿供体食用的相同的配方奶。CMA婴儿供体接受了深度水解酪蛋白配方奶(EHCF)以控制持续的过敏症状，而健康供体接受了标准的基于牛奶的配方奶(5)。最初的转移接受者用作后续实验的活储存库(参见方法部分)。

[0112] 用BLG和粘膜佐剂霍乱毒素(CT)使GF小鼠组和健康婴儿或CMA婴儿微生物群定植的小鼠组致敏。无任何细菌定植的GF小鼠对食物很容易有过敏反应，证明为核心体温下降(图1A)和BLG特异性IgE和IgG1产生(图1B、C)(7,11)。发明人还测量到定植来自四个CMA供体的每一个的粪便样品的小鼠受BLG激发而核心体温显著降低(图1A)。与健康定植的小鼠相比，致敏的CMA定植的小鼠产生明显更高的BLG特异性IgE(图1B)、IgG1(图1C)和mMCPT-1(图1D)血清浓度。突出地，所有接受四个健康婴儿微生物群的小鼠都得到保护而免于BLG激发的过敏反应。它们在激发后的核心体温与在GF或CMA定植的小鼠中测得的显著不同(图1A)。组织学分析未揭示在激发后(图5)或长期定植后(图6)获得的回肠或结肠组织样品中的病理或炎症的任何证据。微生物分析表明，健康和CMA定植的小鼠组之间的群落多样性和均匀性相似(图7)。为了研究含有牛奶的配方奶是否对健康定植的小鼠产生与微生物群无关的抗过敏保护，发明人从母乳喂养的健康和CMA供体进行了另外的粪便转移(补充表2)。受体小鼠仅接受基于植物的小鼠食物。被母乳喂养的健康供体的粪便定植的小鼠受到保护而对BLG致敏和激发没有过敏反应。但是，与健康定植的小鼠相比，母乳喂养的CMA供体的粪便定植的小鼠表现出明显更多的核心体温下降(图8A)和更高水平的BLG特异性IgE(图8B)。还比较了喂食水或Enfamil的GF小鼠对BLG的致敏性。两组小鼠均对BLG致敏反应强烈(图9)。激发后它们的核心体温下降或BLG特异性IgE或IgG1的血清浓度无明显差异。然而，喂养含牛奶的配方奶的小鼠体内的血清mMCPT-1被抑制。

[0113] 对8个配方奶喂养的人类婴儿供体的粪便样品进行分析(补充表1)，确定了58个操作分类单位(OTU)，它们在健康和CMA婴儿之间存在差异(图2A;补充表3)。由于在单个OTU水平上每个供体和鼠移植受体之间都存在差异，发明人检测了供体来源的微生物组组成差异是否能够区分定植的小鼠组。作为呈现数据的汇总量度，发明人计算了潜在的“保护性”OTU(在健康供体中较多，n＝34)和潜在的“非保护性”(在CMA供体中较多，n＝24)OTU的数量，以得到每个供体的存在/不存在比率(图10A;参见方法部分)。另外，发明人基于每个OTU在样品中的相对丰度计算了加权分数(以下称为丰度分数)(图2A;参见方法部分)。当绘制OTU丰度分数与存在/不存在比率的关系图时，供体按比率分为健康组和CMA组(图10B，正方形)。该阈值还通过它们的生物学表型区分了CMA定植小鼠和健康定植的小鼠(图10B，圆圈)，表明该供体来源的聚集微生物群特征在鼠移植受体中得到验证。通过重新分析先前发表的研究中收集的16S粪便样品数据(5)，健康婴儿相对于CMA婴儿的保护性/非保护性OTU的比率显著更高的结果在相同的那不勒斯群体的不相关样品组中独立得到证实(图11)。当绘制供体来源的OUT比率与过敏性疾病的生物标志物包括BLG特异性IgE(图2B)、BLG特异性IgG1(图2C)和mMCPT-1(图2D)的关系图时，健康和CMA定植的小鼠也被分开。有趣的是，线性判别差异贡献(LEfSe)分析(图2E、F)显示，梭菌纲的毛螺菌科在健康定植的小鼠中富集(7)。

[0114] 对饮食抗原的耐受始于其在小肠中的吸收(4,12)。大多数共生细菌都处于结肠中;在小肠中，回肠中的细菌最多(13)。这些细菌与IEC的相互作用是调节宿主-微生物界面免疫性的关键(13,14)。回肠IEC从8个婴儿供体的每一个定植的小鼠组分离，并通过RNA测

序量化基因表达(图3A)。与CMA定植的小鼠相比,健康定植的小鼠上调了独特的回肠基因集(图3A;补充表4)。例如,编码小肠上皮细胞中大量表达的关键糖异生酶的Fbp1在所有健康定植的小鼠中显著上调(15)(图3A)。Fbp1的表达减少与从氧化磷酸化到有氧糖酵解的代谢转变有关(16、17),这改变了上皮的氧合作用并导致生态失调(18)。相对于健康定植的小鼠,Tgfbr3和Ror2在CMA定植的小鼠的回肠中下调(图3A)。Tgfbr3编码生长因子TGF-β的受体,并在乳鼠的小肠中大量表达(19)。母乳中存在高浓度的可溶性TGFβRIII和TGF-β2;Wnt5a对TGF-β信号转导的激活是通过Ror2介导的,并且对上皮修复重要(20)。相比之下,参与丙酮酸代谢的基因Acot12和Me1在CMA定植的小鼠回肠中相对于健康定植的小鼠有上调。这些代谢和分子过程反映在如图3B中所示的在CMA定植和健康定植的小鼠中显著改变的基因属性分类途径中。

[0115] 为了确定图2中识别的粪便OTU特征是否反映了回肠细菌种群,发明人检测了健康和CMA定植的小鼠中回肠OTU与粪便特征之间的相关性(图12A)。已发现,在小鼠粪便和回肠样品之间,大多数分类群相对于CMA按相同方向变化(丰度增加或减少)(图12B,C)。对来自健康定植和CMA定植的小鼠的回肠IEC中差异基因表达的鉴定(图3A)表明回肠细菌调节宿主免疫力以促进过敏性致敏。回肠细菌和回肠差异表达基因(DEG)的综合分析显示9个OTU与健康定植或CMA定植小鼠的回肠中上调的基因显著且一致相关(图4A)。有趣的是,与在健康定植的小鼠回肠中上调的DEG相关的保护性OTU中,3/5是毛螺菌科家族的成员。针对NCBI数据库(16S核糖体RNA、细菌和古细菌)对组装的16S序列进行的BLAST搜索显示,在健康定植的小鼠中上调的所有的三种保护性毛螺菌OTU(259772,新18,177986)中,粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)是最接近的匹配物种。特别地,在先前对人类婴儿粪便和饮食的研究中,OTU259772带有粪厌氧棒杆菌注释(21)。粪厌氧棒杆菌是不形成孢子的,利用乳酸盐和乙酸盐产生丁酸盐(22,23)。毛螺菌科OTU259772与图3A中的几个高度相关的目的回肠DEG(Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot12和Me1)之间的Spearman相关性如图4B所示。使用先前已验证的物种特异性引物对回肠和粪便样品进行了定量PCR(qPCR)分析(24),提供了在健康定植的小鼠中的粪厌氧棒杆菌富集的独立证明(图4C至图4E和图13A至图13C)。回肠样品中粪厌氧棒杆菌的丰度也与来自回肠IEC的DEG相关(图14)。值得注意的是,两个高度相关的DEG(Acot12和Me1)参与丙酮酸代谢。丁酸盐是结肠上皮细胞的重要能源(25)。丁酸盐通过β-氧化作用驱动结肠细胞耗氧,从而维持产生丁酸盐的专性厌氧菌的局部低氧生态位(26)。在生态失调的情况下,结肠细胞通过糖酵解产生能量,这一过程包括产生丙酮酸作为关键中间体(27)。很容易推测,来自CMA定植小鼠的IEC中产生丁酸盐的粪厌氧棒杆菌的丰度与丙酮酸代谢相关基因之间的负相关反映了在生态失调条件下回肠上皮功能的代谢变化。

[0116] 接下来检测了粪厌氧棒杆菌是否可以通过单定植化GF小鼠来模拟基因表达的变化以及针对与健康微生物群相关的过敏反应的保护作用(参见方法部分)。当与GF或CMA定植的小鼠相比时,在健康定植的小鼠中显著上调的一些基因(Fbp1、Tgfbr3)在粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠中也显著上调(图4F)。Acot12表达在CMA定植的小鼠中显著上调,但在健康定植的小鼠或粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠中未显著上调(图4F)。BLG加CT致敏的粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠受到保护而免受BLG激发的过敏反应。如图1所示,CMA定植的小鼠的核心体温显著下降,表明出现了过敏反应(图4G)。与CMA定植的小鼠相比,在粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠中,核心体温和mMCPT-1的血清浓度的变化均显著减少(图4G,J)。抗原特异性、Th2

依赖性、抗体(血清BLG特异性IgE和IgG1)(图4H,I)和细胞因子应答IL-13和IL-4(图4K,L)在粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠中均降低。

[0117] 发明人已经表明,梭菌纲中厌氧、与粘膜相关的细菌已经引起极大关注,因为据报道它们通过诱导调节性T细胞(28、29)、产生免疫调节的代谢物(30、31)和调节定植抗性(32)来维持肠道内稳态。发明人已经表明,这种免疫调节细菌存在于回肠中、在食物吸收的部位,并且已经证明它们在食物过敏反应中的保护作用。本文所述的回肠基因表达中与梭菌相关的变化的机理分析很可能揭示了对维持饮食抗原的耐受性至关重要的其他途径。本报告中描述的模型未说明是过敏状态导致生态失调(33)还是生态失调先于过敏。确实,许多因素很可能有助于食物过敏的发展。该数据表明,共生细菌在防止对食物的过敏反应中起着重要作用,并为开发预防或治疗这种疾病的微生物组调控策略提供了概念证明。

[0118] C.方法

[0119] 悉生小鼠饲养。所有小鼠饲养并安置在悉生研究动物设施(GRAF)中。将小鼠保持在Trexler型柔性薄膜隔离房单元(生物级清洁)中,其配有Ancare聚碳酸酯小鼠笼(产品目录号N10HT)和Teklad松屑(7088;通过高压灭菌),处于20℃至24℃的室温,设置12小时的明/暗循环。向小鼠自由提供USP级、pH 5.2的高压灭菌水。每周更换草垫;由于配方奶从瓶中漏出,配方奶饲养的小鼠的笼子需要几乎每天更换草垫。根据实验动物的护理和使用指南(2013年第8版),将所有小鼠喂食Purina Lab Diet®5K67,并保持在温度可控的环境中。食物在121℃进行30分钟的高压灭菌。通过培养和通过qPCR对粪便样品进行16S rRNA分析每周检查隔离房的无菌性。在BHI、营养物和Sabbaroud液体培养基中于37℃有氧和厌氧、42℃有氧培养96小时。通过IDEXX Radil或Charles River Lab使用无污染模式筛查,在重新鉴定或接收所有内源和外源寄生虫、完整的血清学特征和/或PCR、细菌学以及主要器官的肉眼和组织学分析,对所有小鼠进行初步筛选。将无菌(GF)C3H/HeN小鼠从T.Golovkina(芝加哥大学)转移到该设施内。

[0120] 人粪便样品的制备。健康(非过敏性)粪便样品从接种计划参与者中获得。这些对象没有发生特应性疾病的风险,他们的临床病史对任何过敏性疾病均呈阴性。CMA婴儿由第三级儿科过敏中心(那不勒斯大学“Federico II”转化医学系的儿科过敏计划)确诊;有关完整的患者信息,请参见补充表1和2。本研究的所有方面均根据赫尔辛基宣言进行,并得到那不勒斯大学“Federico II”伦理委员会的批准。已从所有参与研究的孩子的父母/监护人那里获得了书面知情同意。在诊所将新鲜的粪便样品收集在无菌试管中、称重,每100mg至500mg与2mL LB液体培养基+30%甘油混合、等分入无菌冷冻瓶中,并立即在-80℃下保存。样品用干冰运送到芝加哥大学,并在-80℃下保存直至均质。为了定植小鼠,将冷冻的粪便样品引入厌氧室并解冻。将解冻后的粪便与3mm硼硅酸盐玻璃珠在50mL的无菌试管中混合,试管中有2.5mL预先还原的PBS+0.05%半胱氨酸,轻轻施以涡旋以分离。将所得的均质物通过100μm的过滤器过滤。将该均质化和过滤过程再重复三遍,并将最终滤液与等体积的30%甘油+0.05%半胱氨酸混合。将该溶液等分到带有橡胶塞子的Balch管中,以运输和引入悉生隔离器中。将剩余的粪便溶液等分冷冻在-80℃下。

[0121] 定植无菌小鼠。将所有小鼠在3周龄时断奶于基于植物的小鼠食物上(Purina Lab Diet® 5K67),并在断奶时定植。GF小鼠饮用高压灭菌的无菌水。雄性和雌性小鼠均用于所有实验。每组实验均是同窝幼崽对照。通过唯一的5位数字耳标标识所有小鼠。所有工作均

根据机构生物安全及动物护理和使用委员会的规定进行。每个人类婴儿供体的转移都保持在其自己的柔性膜隔离器中，以避免交叉污染。在所有实验中，都通过用500μL新鲜制备的婴儿粪便均质物对GF小鼠进行灌胃，从人类粪便供体创建储存库小鼠。然后使用这些储存库，通过小鼠粪便灌胃经小鼠之间转移定植随后的实验小鼠。通过16S rRNA分析定期检查来自储存库和实验小鼠的粪便样品，结果表明，通过灌胃从储存库小鼠到实验小鼠的小鼠之间的转移具有高度的重复性和随时间的稳定性。为了定植实验小鼠，将来自储存库小鼠的新鲜排泄的粪粒在1mL无菌PBS中均质化，并将250μL的这种均质物用于灌胃一只受体小鼠。对于喂食婴儿配方奶的小鼠，在定植前四个小时用配方奶代替饮用水。定植有健康婴儿粪便的小鼠自由喂食Enfamil婴儿奶粉(美赞臣营养品公司，Evansville，IN)，CMA定植的小鼠自由喂食深度水解酪蛋白配方奶(EHCF)，Nutramigen I(美赞臣营养品公司)。干燥形式和液体形式的配方奶均被使用。根据制造商的说明将干配方奶与高压灭菌的USP级无菌水混合。所有的配方奶每天更换。

[0122] 对于粪厌氧棒杆菌单定植的小鼠，将粪厌氧棒杆菌(DSM-14662，DSMZ)在厌氧室(Coy，B型)的还原的Schaedler液体培养基(Remel)中于37℃过夜培养至光密度(OD600)为1.08。给GF小鼠灌胃250μL(约$2.5x10^8$CFU)。用物种特异性引物通过qPCR监测这些小鼠的定植情况(补充表6)，并将其作为活储存库保存。为了定植实验小鼠，在定植前四个小时将Enfamil婴儿配方奶(液体)添加到饮用水中。然后将来自储存库小鼠的新鲜排泄的粪便粒在1mL无菌PBS中均质化，并将250μL这种均质物用于对一只受体小鼠进行灌胃。通过对所有实验小鼠处死时收集的粪便样品进行16S rRNA靶向测序，证实粪厌氧棒杆菌的单定植化。

[0123] 16S rRNA靶向测序。使用Power Soil DNA分离试剂盒(MoBio)提取细菌DNA。16S rRNA基因扩增子测序是在阿贡国家实验室的环境样品制备和测序设施上的Illumina MiSeq上进行的。采用参考文献34中所述的程序，从粪便样品中生成带有12bp条形码的151bp的配对末端读取。用区域特异性引物(515F-806R)PCR扩增16S rRNA基因的V4区，该引物包括Illumina流动池中用的测序仪衔接子序列。通过微生物生态学定量分析(QIIME)(1.9版)分析了由婴儿供体粪便样品、悉生小鼠粪便和回肠样品(n＝99)组成的微生物群特征群(35)。修剪原始读取以除去低质量的碱基；使用SeqPrep(可在万维网github.com/jstjohn/SeqPrep找到)合并成对末端3'重叠序列。开放参考OTU提取方式以相对于Greengenes数据库(08/2013版本)序列同一性97％使用(36)。序列用PyNAST对齐(37)；使用uclust共识分类法分类器进行分类分配(38)；使用ChimeraSlayer(v20110519)(可在万维网的microbiomeutil.sourceforge.net找到)删除预测的嵌合序列。供体和定植的小鼠群体的数据被纯化至3160个读取的等深度(n＝99，由供体粪便样品、定植后2周和3周的小鼠粪便样品以及小鼠回肠样品组成)，且小鼠群组的数据被纯化至10050个读取的等深度，如图12C中所示(n＝70，由定植后1周的35个小鼠成对的粪便和回肠样品组成)。分别在R语言vegan包(v2.4.5)中使用双侧Mann-Whitney-Wilcoxon检验(非参数)和加权UniFrac距离的PERMANOVA比较CMA和健康组的α(香农指数)和β多样性指标(39)。Pielou均匀度指数J'的计算公式为$J' = \frac{H'}{\ln S}$，其中H'是香农指数，S是OTU的最大数量。离散错误发现率(DS-FDR)(40)用于确定CMA组与健康组的粪便群之间差异丰富的细菌类群，其参数为“transform_type＝normdata，method＝meandiff，alpha＝0.10，numperm＝1000，fdr_method＝dsfdr”(访问

02262018)(https://github.com/biocore/dsFDR)。与Benjamini-Hochberg-FDR(BH-FDR)方法相比,DS-FDR方法在有限的样品量下具有更高的功效,并且对于稀疏的数据结构(微生物丰度表中比例的低非零值)效果好,因此特别适用于微生物群落的数据分析(40)。DS-FDR算法不计算调整后的P值;相反,它通过排列组合测试(默认1000次排列组合)估计错误发现率,该测试将FDR控制在所需的水平(0.10)。这样,它计算原始P值、检验统计量和输出中拒绝的假设(补充表3和补充表5)。在每个比较中,在应用DS-FDR检验之前,先将存在于少于4个样品中的OTU去除。使用线性判别差异贡献分析(LEfSe),使用每个样品的归一化值1000000和其他参数的默认值,确定在CMA或健康组中相对于其他组显著富集的属。在LEfSe分析中,计算两组之间差异丰富的分类单位的线性判别分析(LDA)得分。认为$P<0.05$(Kruskal-Wallis检验)和log10(LDA)≥2.0(或≤-2.0)的分类单位是显著的。对于图2A,在使用DS-FDR对供体CMA和健康组进行差异丰度测试之后,发明人通过要求至少在两个小鼠组中存在进一步过滤了显著的OTU,总共留下58个OTU用于进一步分析。通过将每个样品的潜在保护性OTU总数(健康组中含量较高)除以潜在的非保护性OTU总数(CMA中含量较高)来计算OTU比率。另外,OTU丰度分数计算时考虑到了在CMA中确定的相对于健康供体粪便样品的58个OTU的丰度,如图2A所示。首先,对相对丰度进行数据转换,使信号接近高斯分布。将每个OTU的相对丰度乘以一个常数(1×10^6),以使所有值均大于1,进行log10转换,然后通过将该值除以它们在样品中的均方根来进行缩放。潜在的非保护性OTU的丰度乘以(-1)。接下来,计算58个OTU的变换后的丰度之和,以生成综合得分。为了验证独立群体中的OUT比率差异,发明人使用如上所述相同的分析方式,使用纯化至6424个读取的等深度的数据,重新分析了参考文献5中从健康和CMA婴儿(n=38)收集的粪便样品的16S测序数据。在图2A所示的58个OTU中,给55个OTU分配已知的参考ID,给3个OTU分配新的参考ID(补充表3)。新的参考OTU ID在不同分析群体之间不具有可比性,因此,发明人的关注焦点是具有已知参考ID的OTU。在55个已知的OTU中,有52个在重新分析的独立群体中匹配,并用于计算保护/非保护性OUT的比率,如图10所示。

[0124] 食物过敏原的致敏和激发。方案改编自参考文献7。所有小鼠在3周龄时断奶于基于植物的小鼠食物(Purina Lab Diet®5K67)上。GF小鼠接受高压灭菌的无菌水。对于用婴儿供体粪便定植的小鼠,或用粪厌氧棒杆菌进行单定植的小鼠,在定植前四个小时用配方奶代替饮用水。定植有健康粪便或粪厌氧棒杆菌的小鼠接受了Enfamil;CMA定植的小鼠接受了Nutramigen(均来自美赞臣)。在第0天,断奶(GF)或定植(健康/粪厌氧棒杆菌/CMA)后一周,将所有小鼠禁食4小时,然后填喂200mM碳酸氢钠。30分钟后,给小鼠20mg BLG(Sigma)加10μg CT(List Biologics)。此方案每周重复,持续5周。对于配方奶喂养的小鼠,在最后一次致敏后的那周用无菌水代替配方奶。在第42天激发之前,将小鼠禁食4小时并填喂碳酸氢钠。然后隔30分钟通过灌胃分别施用两剂每剂100mg BLG。使用直肠探针(PhysiTemp),在过敏原激发之前和第一次激发之后每5分钟盲法测量核心体温,直到第二次激发之后至少30分钟。第二次激发后1小时收集血清以测量mMCPT-1水平。激发后24小时收集血清用于抗体测量。

[0125] ELISA。根据制造商的方案(eBioscience),将在第二次激发后1小时收集的血清中定量测定mMCPT-1。使用参考文献7修改的方案进行BLG特异性ELISA。简而言之,将酶标板涂覆100μg/mL BLG,置于100mM碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中于4℃保存过夜。在室温下用3%

BSA将酶标板封闭2小时。将样品加入1％BSA中，并在4℃下培育过夜。使用来自用BLG+铝佐剂(alum)免疫的小鼠的在CNBr-Sepharose亲和柱上纯化的BLG特异性抗体(IgE或IgG1)对试验进行标准化(42)。用山羊抗小鼠IgE-UNLB(Southern Biotech)和兔抗山羊IgG-AP(ThermoFisher)检测BLG特异性抗体，然后用p-NPP(KPL Labs)或IgG1-HRP(Southern Biotech)进行显色，并用TMB(Sigma)进行显色。

[0126] 为了进行细胞因子分析，从用BLG+CT致敏5周的粪厌氧棒杆菌或CMA定植的小鼠中在激发后24小时获取脾脏。在37℃以2x10^{6}个细胞/毫升的浓度、用10％CO_2和10mg/ml的BLG(Sigma)cDMEM溶液(含4％FCS(HyClone)、10mM HEPES(Gibco)、100U/ml青霉素/链霉素(Gibco)和55μM的2-巯基乙醇(Gibco))刺激脾细胞。通过IL-13和IL-4(均来自Invitrogen)ELISA测定在72小时培养的上清液中的细胞因子浓度。

[0127] 上皮细胞分离。如致敏实验中的，小鼠在3周龄时断奶，并在定植前食用婴儿配方奶。定植后七天，对小鼠实施安乐死并取出回肠。为了IEC分离，如参考文献(43)中所述清理组织并翻转。在翻转的组织中充入细胞恢复溶液(Corning)，IEC每5分钟收集一次，持续30分钟。IEC样品在TRIZol(ThermoFisher)中裂解，并用PureLink RNA迷你试剂盒(Ambion)和柱上DNA酶处理(PureLink DNase Set，Ambion)提取RNA。

[0128] RNA测序。使用具有Ribo-Zero人/小鼠/大鼠的TruSeq链式总文库制备试剂盒(Illumina)来制备RNA文库。使用HiSeq2500仪器的50bp单读取化学方法，在芝加哥大学功能基因组核心实验室对样品进行测序，并在两个泳道中进行重复测序。通过FastQC(v0.11.5)评估原始读取的质量(44)。39个RNA测序样品的QC30得分为96.81％±0.06％(平均值±平均值的标准误差)，这代表质量得分≥Q30的碱基的百分比。通过Kallisto(v0.43.1)以链特异性模式将小鼠参考转录组与Gencode基因注释(vM16，GRCm38)进行对齐(45)。该模式实现了基于kmer的伪对齐算法，以准确地量化RNA测序数据中的转录本，同时可靠地检测读取中的错误。基于与参考转录组的Kallisto伪对齐，平均比对率为62.77％±1.10％(平均值±平均值的标准误差)。平均每个样品产生3500万个原始测序读取，使用Kallisto将2200万个比对到转录组。转录水平的丰度通过指定的链特异性方案进行定量，使用tximport(v1.4.0)(46)归纳成基因水平，通过M值的修剪均值(TMM)归一化，并进行log2-转换。保留在至少3个样品中表达的基因(每百万读取计数(CPM)>3)用于进一步分析。使用具有精确权重的limma voom算法(v3.34.5)识别组间差异表达的基因(47)。使用duplicateCorrelation函数估计以供体(1至8)作为阻断因子的小鼠样品之间的相关性。lmFit函数用于将所有小鼠样品(n＝39，18个CMA定植，18个健康定植和3个GF)拟合到一个线性模型中，其中合并了以上计算的关联结构。将对比设置为CMA与健康，CMA与GF以及健康与GF，以确定每个比较中的DEG。使用两步法确定CMA与健康之间显著差异表达且也不同于GF小鼠的基因：(1)检测在CMA与健康比较中存在差异的基因，变化倍数≥1.5或≤-1.5，错误发现率(FDR)校正的p值小于0.10；(2)进一步筛选步骤(1)中的基因，其在CMA与GF或健康与GF的比较中的变化倍数≥1.5或≤-1.5，FDR为0.05。在步骤(2)中应用更严格的FDR阈值(0.05)以优先列出相对于阴性对照(GF)潜在的真正阳性。使用Benjamini-Hochberg FDR(BH-FDR)方法进行多次测试校正(48)。共有32个DEG通过了这些阈值，代表了定植小鼠中四种类型的基因表达变化：(1)在健康组中升高：相对于CMA和GF在健康小鼠中上调的基因；(2)在CMA组中升高：相对于健康和GF在CMA小鼠中上调的基因；(3)在健康组中下降：相对于

CMA和GF在健康小鼠中下调的基因;(4)在CMA组中下降:相对于健康和GF在CMA小鼠中下调的基因。在图3A和4A中示出了四组DEG。使用clusterprofiler(v3.6.0)(49)以错误发现率(FDR)校正的p值小于0.10(BH-FDR方法,超几何测试)确定在相关32个目的DEG中显著富集的基因属性分类和KEGG通路。为进行此分析,DEG分为两组:(1)健康,包括健康组中升高和CMA组中下降的所有基因;(2)CMA,包括CMA组中升高和健康组中下降的所有基因。使用Spearman秩相关方法计算CMA和健康样品之间丰度显著差异的DEG与回肠OTU之间的相关性,然后应用筛选以(1)保留与指定组中的至少1个DEG表现出P<0.05的显著相关的OUT。对于潜在保护性的OTU(更富集在健康中),它们与"健康组中升高"或"健康组中下降"中的基因相关;对于潜在非保护性OTU(更富集在CMA中),它们与"CMA组中升高"或"CMA中下降"中的基因相关;(2)保留与指定组的至少60%的DEG呈现出相对一致的正相关趋势(Spearmanρ>0.20)的OUT。对于潜在保护性的OTU,它们与"健康组中升高"和"CMA组中下降"中的基因相关;对于潜在非保护性OTU,它们与"CMA组中升高"和"健康组中降低"中的基因相关;(3)保留存在于至少3个CMA和3个健康小鼠中的OTU。9个回肠OTU通过这些相关筛选,并示于图4A中。使用Spearman相关性方法计算超过检测限的样品的OTU相对丰度与基因表达之间的相关性。

[0129] qPCR。通过如参考文献7中所述的qPCR检测基因表达。简而言之,使用iScript cDNA合成试剂盒(BioRad)从RNA制备cDNA。根据制造商的说明,使用PowerUp SYBR Green master mix(Applied Biosystems)测量基因表达。引物如补充表7中所示(20,50至54)。将相关基因的表达归一化为Hprt。相对表达使用以几何平均值为中心的ΔΔCt进行测量;用GF小鼠作为参考。

[0130] 如参考文献(25)中所述,使用qPCR确认粪便和回肠样品中粪厌氧棒杆菌的存在。使用Power Soil DNA分离试剂盒(MoBio)提取细菌DNA,并使用PowerUp SYBR Green master mix(Applied Biosystems)进行qPCR,4μl的每种引物使用10μM工作稀释液和2μl细菌DNA。引物在补充表6中列出。反应的循环条件组成为活化循环50℃、2分钟,然后是95℃、10分钟的一个循环,以及94℃、20秒,55℃、20秒和72℃、50秒的40个循环。在该循环的最后一步中检测荧光探针。在PCR结束时进行融解曲线检测以确认PCR产物的特异性。相对丰度表示为2^{-Ct},归一化为总16S rRNA拷贝数每克粪便材料,再乘以常数($1x10^{25}$),以使所有值均高于1。

[0131] 组织病理学分析。为了进行组织学分析,将3毫米的结肠中段和回肠中段组织用10%福尔马林固定进行H&E染色,或用Carnoy固定剂固定进行过碘酸雪夫(PAS)染色。切片和染色由芝加哥大学人类组织资源中心进行。所有切片由胃肠道病理学家以盲法复查。

[0132] 统计分析。使用Prism 7.0(GraphPad)进行Bonferroni校正的单因素方差分析(图4F),用于多重比较和双侧学生t检验(图4D和图13B),如图中的图例所示。将CMA组与健康组进行比较,使用DS-FDR方法来识别显著的OTU(图2A、图4C和图13A)。使用BH-FDR方法进行RNA测序分析(图3A)和GO富集分析(图3B)中的多重检验校正。使用双侧非参数Mann-Whitney-Wilcoxon检验比较香农多样性和Pielou均匀度(图7A、B)。使用双侧Mann-Whitney-Wilcoxon检验对较大的独立婴儿群中的保护性/非保护性out的比率进行分析(图11)。采用基于R语言(lmerTest v3.0.1)的限制最大似然法(REML)的线性混合效应模型(55)探索不同供体定植小鼠对BLG致敏的生物学反应(图1A至图1D、图4G、图8A、图9A)(56)。

各组(图1A中的GF、健康和CMA;图4G中的粪厌氧棒杆菌和CMA;图8A中的健康BFD和CMA BFD;图9A中的H_2O和Enfamil)温度随时间的变化(线性和二次)建模为温度＝组+时间*组+时间*时间*组,其具有为各个小鼠估计的随机截距和斜率。采用用于多重比较的Benjamini-Hochberg FDR(BH-FDR)调整的t检验进行组温度趋势对比。为了控制组包含多个供体的情况(图1A),对先前的模型进行更新,以包括嵌套在每个供体中的小鼠,作为随机效应,并重复对比。由于两个模型的结果一致,因此报告第一个模型的结果以确保方法的一致性。对于图1B至图1D,将抗体浓度进行log转换,并建模为log(浓度)＝组,以供体作为随机效应。使用前面提到的方法进行组差异的对比。对于图4H至图4I、图8B至图8D、图9B至图9D,对抗体和细胞因子浓度进行log转换并使用t-检验进行比较。数据分析指定(包括数据文件和Rmarkdown文件,以提高重现性)可以根据要求从作者处获得。

[0133] D.表

[0134]

补充表 1. 本研究中使用的配方奶喂养的婴儿供体的患者数据

	健康				CMA			
供体 ID #	1	2	3	4	5	6	7	8
性别	男	男	男	男	男	男	男	男
分娩方式	剖宫产	剖宫产	剖宫产	剖宫产	剖宫产	剖宫产	剖宫产	剖宫产
孕龄	足月	足月	足月	足月	足月	足月	足月	足月
母乳喂养	<14 天	<14 天	<14 天	<14 天	<14 天	<14 天	<14 天	<14 天
粪便收集时的年龄	6 个月	6 个月	6 个月	6 个月	6 个月	6 个月	6 个月	6 个月
CMA 症状开始的年龄	--	--	--	--	2 个月 12 天	2 个月	6 个月	5 个月 20 天
CMA 诊断时的症状	--	--	--	--	荨麻疹和呕吐	荨麻疹和呕吐	湿疹、荨麻疹和呕吐	湿疹和呕吐
IgE 介导机制	--	--	--	--	是	是	是	是
诊断时皮肤点刺试验值(mm)								
-α-乳清蛋白	--	--	--	--	5	12	10	4
-β-乳球蛋白	--	--	--	--	3	3	1	10
-酪蛋白	--	--	--	--	3	5	4	8
-全脂奶	--	--	--	--	7	6	5	7
诊断时总血清 IgE (kU/L)	--	--	--	--	340	127	267	358

[0135] 补充表2.补充图中母乳喂养的婴儿供体患者数据

[0136]

描述	健康婴儿	对牛奶过敏的婴儿
供体 ID #	9	10
性别	女	女
分娩方式	自然	自然
孕龄	足月	足月
母乳喂养	是	是
	(母亲食用牛奶蛋白质)	(母亲食用牛奶蛋白质)
粪便收集时的年龄	6 个月	6 个月
CMA 症状开始的年龄	--	5 个月
CMA 诊断时的症状	--	湿疹、烦躁、呕吐、发育不良、腹泻
IgE 介导机制	--	是
诊断时皮肤点刺试验值 (mm)		
-α-乳清蛋白	--	15
-β-乳球蛋白	--	1
-酪蛋白	--	7
-全脂奶	--	15
诊断时总血清 IgE (kU/L)	--	334

[0137] 补充表3.如图2a所示,CMA供体和健康供体粪便样品之间丰度差异的58个OUT。

[0138]

OTU	变化方向	DS-FDR 拒绝	DS-FDR 检验统计量	DS-FDR 原始 P 值	分类
1111294	健康组中升高	真	-0.184530795	0.015984016	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
360015	健康组中升高	真	-0.068956969	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
新参考OTU147	健康组中升高	真	-0.039674728	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
628226	健康组中升高	真	-0.034540622	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
349024	健康组中升高	真	-0.01594088	0.013986014	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
712677	健康组中升高	真	-0.012704055	0.027972028	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目
780650	健康组中升高	真	-0.010383613	0.012987013	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
843459	健康组中升高	真	-0.009899159	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
262095	健康组中升高	真	-0.007552857	0.01998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
新参考OTU166	健康组中升高	真	-0.005328787	0.006993007	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科
579851	健康组中升高	真	-0.005308631	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
551822	健康组中升高	真	-0.005216137	0.026973027	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科
298247	健康组中升高	真	-0.004133646	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__刺骨鱼菌属; s__
345540	健康组中升高	真	-0.003450891	0.000999001	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
582691	健康组中升高	真	-0.002271895	0.004995005	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
259772	健康组中升高	真	-0.002219727	0.016983017	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__

[0139]

325419	健康组中升高	真	-0.001426612	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
797229	健康组中升高	真	-0.001367202	0.000999001	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
557627	健康组中升高	真	-0.000748282	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
828483	健康组中升高	真	-0.000737522	0.020979021	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属
299267	健康组中升高	真	-0.000617653	0.026973027	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
4448331	健康组中升高	真	-0.000531974	0.030969031	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
3376513	健康组中升高	真	-0.000490385	0.024975025	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
813217	健康组中升高	真	-0.000418414	0.004995005	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
新整理参考OTU56927	健康组中升高	真	-0.000411459	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
335701	健康组中升高	真	-0.000408096	0.032967033	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
191999	健康组中升高	真	-0.000393548	0.008991009	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科
183865	健康组中升高	真	-0.00036463	0.014985015	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
231787	健康组中升高	真	-0.000362215	0.003996004	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
342397	健康组中升高	真	-0.000334965	0.006993007	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
581782	健康组中升高	真	-0.000327138	0.012987013	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
304641	健康组中升高	真	-0.000299547	0.014985015	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科;

[0140]

					g__; s__
4389289	健康组中升高	真	-0.000274745	0.032967033	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
541119	健康组中升高	真	-0.000220503	0.032967033	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
195258	CMA 组中升高	真	0.000463044	0.000999001	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__卵形
315846	CMA 组中升高	真	0.0009126	0.012987013	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__[巴恩斯氏菌科]; g__; s__
551902	CMA 组中升高	真	0.001063128	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__; s__
318190	CMA 组中升高	真	0.001133533	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__; s__
591635	CMA 组中升高	真	0.001212852	0.004995005	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__瘤胃球菌属; s__
585227	CMA 组中升高	真	0.001492734	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__颤螺菌属; s__
370225	CMA 组中升高	真	0.001699313	0.008991009	k__细菌; p__放线菌门; c__放线菌纲; o__双歧杆菌目; f__双歧杆菌科; g__双歧杆菌属; s__青春
199354	CMA 组中升高	真	0.003134517	0.012987013	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__[巴恩斯氏菌科]; g__; s__
198866	CMA 组中升高	真	0.003516506	0.002997003	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__紫单胞菌科; g__副拟杆菌属; s__
583398	CMA 组中升高	真	0.003665419	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__
583656	CMA 组中升高	真	0.003887232	0.000999001	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
535375	CMA 组中升高	真	0.004373572	0.000999001	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__

[0141]

1111191	CMA 组中升高	真	0.004749497	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
580629	CMA 组中升高	真	0.005200626	0.017982018	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
365181	CMA 组中升高	真	0.00614329	0.000999001	k__细菌; p__放线菌门; c__红蝽菌纲; o__红蝽菌目; f__红蝽菌科; g__柯林斯氏菌属; s__产气
359809	CMA 组中升高	真	0.007206031	0.006993007	k__细菌; p__变形菌门; c__β-γ-变形菌纲; o__伯克氏菌目; f__产碱杆菌科; g__萨特氏菌属; s__
585914	CMA 组中升高	真	0.007841977	0.001998002	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__紫单胞菌科; g__副拟杆菌属; s__狄氏
365385	CMA 组中升高	真	0.009299774	0.014985015	k__细菌; p__放线菌门; c__放线菌纲; o__双歧杆菌目; f__双歧杆菌科; g__双歧杆菌属; s__
583117	CMA 组中升高	真	0.009878272	0.000999001	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
180082	CMA 组中升高	真	0.011856764	0.002997003	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__紫单胞菌科; g__副拟杆菌属; s__
589071	CMA 组中升高	真	0.016312063	0.002997003	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__单形
514272	CMA 组中升高	真	0.029745704	0.011988012	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
484304	CMA 组中升高	真	0.030173538	0.004995005	k__细菌; p__放线菌门; c__放线菌纲; o__双歧杆菌目; f__双歧杆菌科; g__双歧杆菌属; s__
589277	CMA 组中升高	真	0.052225784	0.001998002	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__

[0142]

补充表4. 在CMA定植和健康定植的小鼠回肠RNA测序样品中表达不同且与阴性对照组(GF小鼠)中不同的32个基因，如图3a所示。

基因	EnsemblGeneID	RNA测序平均表达	DEG 组	CMA组 vs 健康组		CMA组 vs GF组			健康组vs GF组		
				FDR调整的P值	变化倍数	变化方向	FDR调整的P值	变化倍数	变化方向	FDR调整的P值	变化倍数
Slc22a13	ENSMUSG00000074028	2.778111515	健康组中升高	0.029753823	-2.401525743	NE	0.063113496	3.40496861	健康组中升高	0.005425032	8.17711977
Fbp1	ENSMUSG00000069805	5.555254563	健康组中升高	8.17E-05	-2.063132823	ND	0.000581517	2.373595096	健康组中升高	2.38E-07	4.897041951
Apcdd1	ENSMUSG00000071847	1.494018834	健康组中升高	0.049270498	-1.609221514	NE	0.435864462	1.265635652	健康组中升高	0.025785895	2.03668812
Npl	ENSMUSG00000042684	5.041978196	健康组中升高	0.085368856	-1.559896139	NE	0.293803914	1.388291017	健康组中升高	0.024969934	2.165589797
Abcc2	ENSMUSG00000025194	9.209485113	CMA组中升高	0.010848769	1.505881058	CMA组中升高	2.04E-05	2.175407835	ND	0.042313216	1.444608007
Bhmt	ENSMUSG00000074768	1.082085196	CMA组中升高	0.071649815	1.509332678	CMA组中升高	0.010731326	1.975422585	NE	0.410644089	1.308805284
Mfsd2b	ENSMUSG00000037336	1.777883345	CMA组中升高	0.061865715	1.537225758	CMA组中升高	0.000867035	2.82533517	NE	0.075749268	1.837944202
Cyp3a59	ENSMUSG00000061292	2.136791204	CMA组中升高	0.027389658	1.549562876	CMA组中升高	3.05E-05	3.39446921	ND	0.009662128	2.190597918
Lrrn1	ENSMUSG00000034648	1.595303389	CMA组中升高	0.013681852	1.581394892	CMA组中升高	0.007383553	1.714726833	NE	0.777501394	1.084312869
Slc9b2	ENSMUSG00000037994	1.102430337	CMA组中升高	0.085368856	1.605005893	CMA组中升高	0.031991401	2.02570437	NE	0.591859824	1.262116469
Mroh7	ENSMUSG00000047502	3.89754756	CMA组中升高	0.021327414	1.617161783	CMA组中升高	2.72E-03	2.033697925	NE	0.42241223	1.257572339
Grin2a	ENSMUSG00000059003	2.458692024	CMA组中升高	0.085653544	1.617995585	CMA组中升高	0.044336212	1.964067568	NE	0.676602939	1.213889325
Cntn1	ENSMUSG00000055022	1.148935328	CMA组中升高	0.014593455	1.651618302	CMA组中升高	0.005875115	1.875544221	NE	0.68375077	1.135579703
Letm2	ENSMUSG00000037363	1.650075654	CMA组中升高	0.018797255	1.66583385	CMA组中升高	0.001104306	2.371462071	NE	0.242181977	1.423588595
Ptafr	ENSMUSG00000056529	1.301260118	CMA组中升高	0.073471735	1.694815563	CMA组中升高	0.021173615	2.232120867	NE	0.540574153	1.317028776
Me1	ENSMUSG00000032418	4.3922554	CMA组中升高	0.016384547	1.703263564	CMA组中升高	0.03823817	1.603254667	NE	0.863312513	-1.062378672
Smco1	ENSMUSG00000046345	1.23463105	CMA组中升高	0.090599686	1.755629553	CMA组中升高	0.026988488	2.508688181	NE	0.501298796	1.428939367
Cyp2b10	ENSMUSG00000030483	7.581089071	CMA组中升高	0.029753823	1.757005744	CMA组中升高	0.009227326	2.023601722	NE	0.699603833	1.151733129
Cyp2j13	ENSMUSG00000028571	4.136663388	CMA组中升高	0.053930421	1.800872438	CMA组中升高	0.001587354	3.68957984	NE	0.120415488	2.048773562
Acot12	ENSMUSG00000021620	5.494716849	CMA组中升高	5.48E-05	2.01501538	CMA组中升高	5.70E-05	2.402984772	NE	0.462442117	1.192539171
Cyp2c29	ENSMUSG00000003053	2.680142327	CMA组中升高	8.17E-05	4.735853239	CMA组中升高	6.17E-03	3.403244621	NE	0.593296835	-1.391570036
Akr1c19	ENSMUSG00000071551	6.653987069	健康组中下降	0.007181957	1.539241268	NE	0.08837154	-1.323738676	健康组中下降	0.000475667	-2.037553198
Gstm1	ENSMUSG00000058135	3.552920591	健康组中下降	0.010848769	1.592387077	NE	0.988990596	-1.002868547	健康组中下降	0.020964575	-1.596954914
Ces1f	ENSMUSG00000031725	6.194279856	健康组中下降	0.027389658	1.893583214	NE	0.186446914	-1.487066804	健康组中下降	0.00373614	-2.815884739
Ces1g	ENSMUSG00000057074	2.742386148	健康组中下降	0.090559257	1.907760384	ND	0.030963104	-1.97871865	健康组中下降	0.001377	-3.774921051
Tgfbr3	ENSMUSG00000029287	1.883866476	CMA组中下降	0.000408545	-2.74659932	CMA组中下降	0.007704498	-2.236046082	NE	0.553319278	1.228328585
Acta1	ENSMUSG00000031972	1.201617812	CMA组中下降	0.027389658	-2.50720332	CMA组中下降	0.006712918	-2.803646543	NE	0.822471304	-1.118236611
Hist1h2bj	ENSMUSG00000069300	1.79373615	CMA组中下降	0.072249982	-1.935238841	CMA组中下降	0.000113721	-3.822281003	ND	0.039087358	-1.97509523
Gp2	ENSMUSG00000030954	0.806917328	CMA组中下降	0.070122494	-1.870775326	CMA组中下降	0.001158966	-2.871474818	NE	0.208403405	-1.534911637
Ddit4	ENSMUSG00000020108	3.745786556	CMA组中下降	0.070340591	-1.576061582	CMA组中下降	0.037955029	-1.679764946	NE	0.861431628	-1.065799056
Hist1h2bn	ENSMUSG00000095217	3.070162335	CMA组中下降	0.08015986	-1.565406563	CMA组中下降	0.000151693	-2.672909018	ND	0.037500512	-1.707485507
Ror2	ENSMUSG00000021464	2.322930094	CMA组中下降	0.03422688	-1.545471585	CMA组中下降	7.86E-05	-2.277636991	NE	0.05497608	-1.473748863

NE：未计算；当DEG未达到对比的“CMA组 vs GF组”或“健康组vs GF组”的筛选标准时，变化方向无法评估。

ND：不确定；当DEG同时达到对比的“CMA组 vs GF组”和“健康组vs GF组”的筛选标准时，将P值较高的重设为不确定以避免冲突。

[0143] 补充表5.CMA和健康小鼠回肠样品之间丰度不同的108个OUT。

[0144]

OTU	变化方向	DS-FDR 拒绝	DS-FDR 检验统计量	DS-FDR 原始 P 值	分类
349024	健康组中升高	真	-0.22217917	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
259772	健康组中升高	真	-0.044282455	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
828483	健康组中升高	真	-0.017799339	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属
262095	健康组中升高	真	-0.015344578	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
332718	健康组中升高	真	-0.012123767	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
360238	健康组中升高	真	-0.007986609	0.011988012	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
238205	健康组中升高	真	-0.004499814	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属; s__酪酸
359750	健康组中升高	真	-0.004188868	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属; s__产气
新参考 OTU16	健康组中升高	真	-0.004114455	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__luteciae
309696	健康组中升高	真	-0.003306804	0.003996004	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
345540	健康组中升高	真	-0.003062398	0.000999001	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
586271	健康组中升高	真	-0.002603169	0.01998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__
356760	健康组中升高	真	-0.002063474	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
303809	健康组中	真	-0.001887759	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲;

[0145]

	升高				o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属; s__酪酸
327851	健康组中升高	真	-0.00174762	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
新参考OTU18	健康组中升高	真	-0.001578146	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
291195	健康组中升高	真	-0.001382348	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
577710	健康组中升高	真	-0.000950458	0.010989011	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__producta
292820	健康组中升高	真	-0.000949102	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
573157	健康组中升高	真	-0.000929379	0.011988012	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目
529116	健康组中升高	真	-0.000921743	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属
579608	健康组中升高	真	-0.000882353	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
289925	健康组中升高	真	-0.000678999	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
177986	健康组中升高	真	-0.000602909	0.028971029	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
新整理参考OTU64312	健康组中升高	真	-0.000594549	0.003996004	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
967427	健康组中升高	真	-0.000546212	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
237444	健康组中升高	真	-0.000487754	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
328283	健康组中升高	真	-0.000459212	0.003996004	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
145801	健康组中	真	-0.00045917	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝

[0146]

	升高				菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
新参考OTU109	健康组中升高	真	-0.000449108	0.026973027	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
592866	健康组中升高	真	-0.000408332	0.017982018	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__
4313711	健康组中升高	真	-0.00035444	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
新参考OTU26	健康组中升高	真	-0.000337736	0.004995005	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
351020	健康组中升高	真	-0.000324044	0.014985015	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__梭菌属; s__新生儿
833731	健康组中升高	真	-0.000280741	0.000999001	k__细菌; p__变形菌门; c__γ-变形菌纲; o__肠杆菌目; f__肠杆菌科; g__; s__
392887	健康组中升高	真	-0.000260077	0.025974026	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
199301	健康组中升高	真	-0.000256085	0.01998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
新整理参考OTU98242	健康组中升高	真	-0.000237095	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
255359	健康组中升高	真	-0.00020765	0.007992008	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
新整理参考OTU22852	健康组中升高	真	-0.000197185	0.010989011	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
新参考OTU72	健康组中升高	真	-0.00018357	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
132041	健康组中升高	真	-0.000168657	0.017982018	k__细菌; p__放线菌门; c__放线菌纲; o__双歧杆菌目; f__双歧杆菌科; g__双歧杆菌属; s__
新整理参考OTU1026	健康组中升高	真	-0.000163884	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__

[0147]

34					
新整理参考OTU48619	健康组中升高	真	-7.42886E-05	0.014985015	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
新整理参考OTU92891	健康组中升高	真	-7.35692E-05	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__芽孢杆菌纲; o__乳杆菌目; f__链球菌科; g__链球菌属; s__
77514	CMA组中升高	真	0.000105274	0.028971029	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
560336	CMA组中升高	真	0.000118911	0.028971029	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
566434	CMA组中升高	真	0.000132797	0.016983017	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__; g__; s__
4352657	CMA组中升高	真	0.000145962	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
367790	CMA组中升高	真	0.000158719	0.028971029	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
3768338	CMA组中升高	真	0.000171334	0.028971029	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
311587	CMA组中升高	真	0.000184786	0.007992008	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
273232	CMA组中升高	真	0.000198366	0.022977023	k__细菌; p__疣微菌门; c__疣微菌纲; o__疣微菌目; f__疣微菌科; g__艾克曼菌属; s__嗜粘蛋白
804526	CMA组中升高	真	0.000198943	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__粪球菌属; s__
331850	CMA组中升高	真	0.000211798	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
4434334	CMA组中升高	真	0.000236036	0.003996004	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
4422039	CMA组中升高	真	0.000259764	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科
343047	CMA组中升高	真	0.000280211	0.00999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__多尔氏菌属; s__

[0148]

295085	CMA 组中升高	真	0.000318338	0.021978022	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
195061	CMA 组中升高	真	0.000318762	0.011988012	k__细菌; p__放线菌门; c__红蝽菌纲; o__红蝽菌目; f__红蝽菌科; g__安德克氏菌属(Adlercreutzia); s__
362539	CMA 组中升高	真	0.000376855	0.015984016	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
新整理参考OTU35999	CMA 组中升高	真	0.000385001	0.026973027	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
587933	CMA 组中升高	真	0.000403677	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__粪芽孢菌属; s__
3002161	CMA 组中升高	真	0.000470934	0.01998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
3715618	CMA 组中升高	真	0.000529033	0.008991009	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
591635	CMA 组中升高	真	0.000561008	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__瘤胃球菌科; g__瘤胃球菌属; s__
249142	CMA 组中升高	真	0.000585252	0.027972028	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__
634449	CMA 组中升高	真	0.000585747	0.018981019	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
318190	CMA 组中升高	真	0.000620436	0.00999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__瘤胃球菌科; g__; s__
548587	CMA 组中升高	真	0.000660208	0.014985015	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
新参考OTU4	CMA 组中升高	真	0.000693503	0.013986014	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
新整理参考OTU11241	CMA 组中升高	真	0.000784602	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
535955	CMA 组	真	0.000789934	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲;

[0149]

	中升高				o__梭菌目; f__消化链球菌科; g__; s__
551902	CMA 组中升高	真	0.000807109	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__; s__
535601	CMA 组中升高	真	0.000857422	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
269611	CMA 组中升高	真	0.000862436	0.016983017	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__瘤胃球菌科; g__; s__
175508	CMA 组中升高	真	0.000942059	0.005994006	k__细菌; p__放线菌门; c__红蝽菌纲; o__红蝽菌目; f__红蝽菌科; g__; s__
585914	CMA 组中升高	真	0.001135819	0.014985015	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__紫单胞菌科; g__副拟杆菌属; s__狄氏
587530	CMA 组中升高	真	0.001147768	0.004995005	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
659361	CMA 组中升高	真	0.001476101	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__多尔氏菌属; s__
新参考 OTU85	CMA 组中升高	真	0.001499115	0.010989011	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__多尔氏菌属; s__
193744	CMA 组中升高	真	0.001689778	0.017982018	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
583656	CMA 组中升高	真	0.001702377	0.014985015	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
631764	CMA 组中升高	真	0.001846097	0.002997003	k__细菌; p__放线菌门; c__红蝽菌纲; o__红蝽菌目; f__红蝽菌科; g__安德克氏菌属(Adlercreutzia); s__
564188	CMA 组中升高	真	0.001945213	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__多尔氏菌属; s__
531675	CMA 组中升高	真	0.001946525	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
新参考 OTU35	CMA 组中升高	真	0.002345204	0.024975025	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__; s__
572860	CMA 组	真	0.002838657	0.001998002	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲;

[0150]

	中升高				o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
362342	CMA 组中升高	真	0.00291165	0.02997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__[瘤胃球菌科]; g__瘤胃球菌属; s__
929836	CMA 组中升高	真	0.003147941	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__粪芽孢菌属; s__
1111191	CMA 组中升高	真	0.003451219	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__活泼
535375	CMA 组中升高	真	0.003453613	0.008991009	k__细菌; p__拟杆菌门; c__拟杆菌纲; o__拟杆菌目; f__拟杆菌科; g__拟杆菌属; s__
551822	CMA 组中升高	真	0.004090919	0.005994006	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科
368486	CMA 组中升高	真	0.004218387	0.003996004	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__[优杆菌属]; s__细长
583398	CMA 组中升高	真	0.00561987	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__[瘤胃球菌属]; s__
新参考 OTU166	CMA 组中升高	真	0.006055017	0.024975025	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科
367213	CMA 组中升高	真	0.006097534	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__瘤胃球菌科; g__; s__
546876	CMA 组中升高	真	0.009753471	0.022977023	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__毛螺菌科; g__布劳特氏菌属; s__
369763	CMA 组中升高	真	0.010722879	0.00999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__粪芽孢菌属; s__
829337	CMA 组中升高	真	0.011237604	0.011988012	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__粪芽孢菌属; s__
592616	CMA 组中升高	真	0.013715698	0.000999001	k__细菌; p__厚壁菌门; c__丹毒丝菌纲; o__丹毒丝菌目; f__丹毒丝菌科; g__; s__
582691	CMA 组中升高	真	0.01557264	0.002997003	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
628226	CMA 组中升高	真	0.024223372	0.004995005	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲; o__梭菌目; f__梭菌科; g__; s__
1078587	CMA 组	真	0.032792882	0.015984016	k__细菌; p__厚壁菌门; c__梭菌纲;

[0151]

	中升高				o__梭菌目;f__毛螺菌科;g__布劳特氏菌属;s__
370183	CMA 组中升高	真	0.044102787	0.01998002	k__细菌;p__厚壁菌门;c__梭菌纲;o__梭菌目;f__毛螺菌科;g__布劳特氏菌属;s__
363731	CMA 组中升高	真	0.055865924	0.025974026	k__细菌;p__疣微菌门;c__疣微菌纲;o__疣微菌目;f__疣微菌科;g__艾克曼菌属;s__嗜粘蛋白
360015	CMA 组中升高	真	0.07274586	0.022977023	k__细菌;p__厚壁菌门;c__梭菌纲;o__梭菌目;f__毛螺菌科;g__[瘤胃球菌属];s__活泼
579851	CMA 组中升高	真	0.082564668	0.000999001	k__细菌;p__厚壁菌门;c__丹毒丝菌纲;o__丹毒丝菌目;f__丹毒丝菌科;g__[优杆菌属];s__细长

[0152] 补充表6.用于qPCR分析粪厌氧棒杆菌的引物序列

[0153]

粪厌氧棒杆菌	F	GTTTTCGGATGGATTTCCTATAT (SEQ ID NO:1)	参考24
	R	CTTTTCACACTGAATCATGCGATT (SEQ ID NO:2)	

[0154] 补充表7.图4f中用于qPCR分析的引物序列

[0155]

Hprt	F	TGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (SEQ ID NO:3)	参考50
	R	AGCAAGCTTGCAACCTTAACCA (SEQ ID NO:4)	
Fbp1	F	CCATCATAATCGAACCTGAG (SEQ ID NO:5)	参考51
	R	CTTCTCAGAAGGCTCATCAG (SEQ ID NO:6)	
Tgfbr3	F	CCGGTGTGAACTGTCACCGATC (SEQ ID NO:7)	参考52修改
	R	CCTGATGAAAACTGGACCACAG (SEQ ID NO:8)	
Ror2	F	ATCGACACCTTGGGACAACC (SEQ ID NO:9)	参考20
	R	AGTGCAGGATTGCCGTCTG (SEQ ID NO:10)	
Acot12	F	CCGTGGCACTAAGGTCAGTT (SEQ ID NO:11)	参考53
	R	ACGTTACGGTGCACGAATTG (SEQ ID NO:12)	
Me1	F	AGTATCCATGAACAAAGGGCAC (SEQ ID NO:13)	参考54
	R	ATCCCATTACAGCCAAGGTC (SEQ ID NO:14)	

[0156] 实施例2:分离和表征、体外发酵、体内初步实验设计

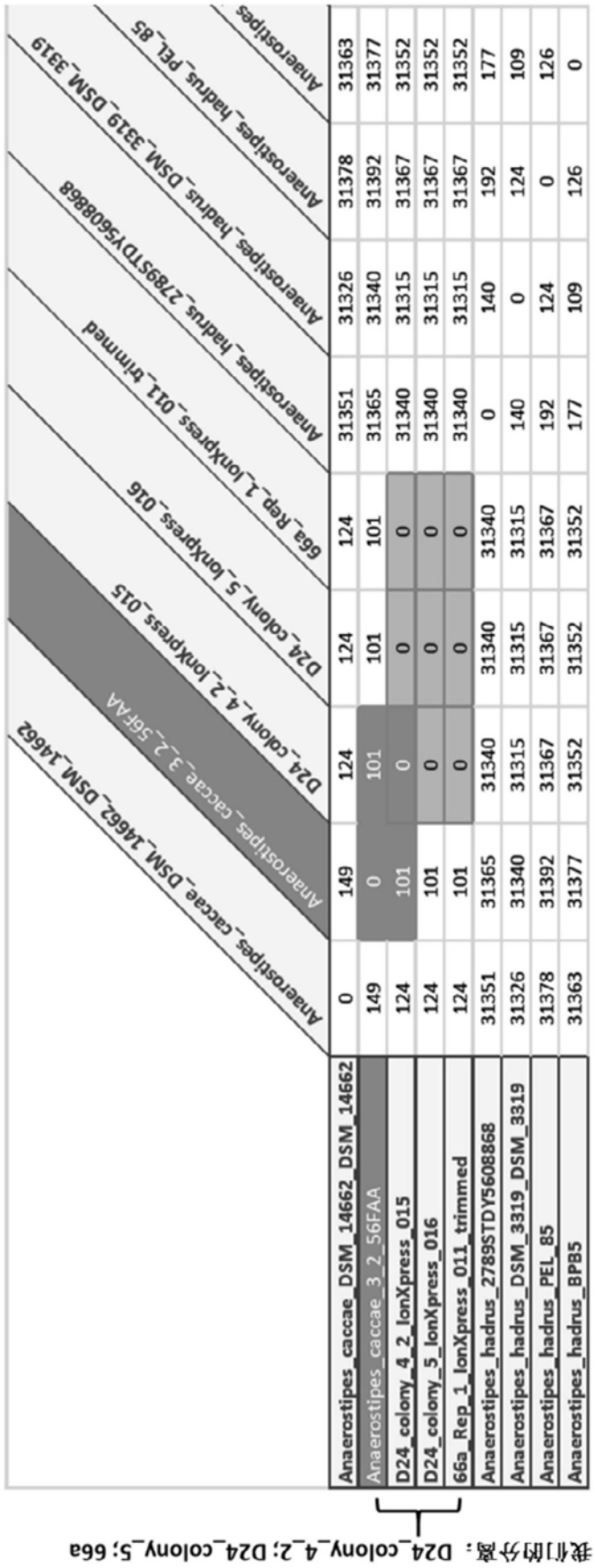
[0157] A.粪厌氧棒杆菌的分离和表征

[0158] 从冷冻在30%甘油储液中的健康婴儿粪便中分离出粪厌氧棒杆菌。首先,将健康供体#2的未稀释的粪便甘油储液接种到补充有维生素K、氯化血红素和抗生素的脑心浸液(BHI)琼脂上。使用的抗生素为16μg/ml环丙沙星,或16μg/ml环丙沙星、6μg/ml庆大霉素、5μg/ml氨曲南和10μg/ml粘菌素的混合物(58,60)。选择该供体的原因是,根据先前的测序数据,他在四个健康供体中具有最高的粪厌氧棒杆菌相对丰度。将平板在37℃的厌氧室中培育六天。然后刮拭平板,将其悬浮在50%的甘油溶液中。然后将该悬浮液等分,将一份用于qPCR,另一份在-80℃下冷冻,用于将来的培养。使用带有对16S rRNA基因的物种特异性引物的qPCR量化粪厌氧棒杆菌的丰度(24)。将来自平板悬浮液中具有最高粪厌氧棒杆菌板丰度的冷冻等分试样稀释并接种在BHI琼脂上,在37℃的厌氧室中培育六天。然后从10^{-5}的稀释液中选择单个菌落,并接种到预还原的碎肉和葡萄糖液体培养基(CMG)中,并在厌氧室中培育过夜。然后取该液体培养基培养物的等分试样用于粪厌氧棒杆菌特异性PCR和通用PCR

16S rRNA扩增用于Sanger测序。取另一等分试样，并用50％甘油溶液1:1稀释，在-80℃下冷冻在冷冻管中。然后，将通过PCR和Sanger测序均对粪厌氧棒杆菌呈阳性的菌落从冷冻的冷冻管中快速划线接种到BHI琼脂上以提高纯度。然后将该平板培养基的单个菌落接种到碎肉+葡萄糖液体培养基中，并在厌氧室中于37℃生长过夜。将这种培养物的等分试样1:1稀释在50％甘油中，并保存在-80℃的冷冻管中用于进一步研究。这种分离示于图15

[0159] 通过CosmosID®全基因组分析来进一步确认粪厌氧棒杆菌的分离。图15中描述的方法产生7种粪厌氧棒杆菌分离株，均衍生自健康供体#2。对通过Sanger测序似乎彼此差异最大的三个菌落(表示为66a_Rep_1_1_IonXpress_011_trimmed，D24_colony_4_2_IonXpress_015，D24_colony_5_IonXpress_016)进行了全基因组测序。所分析的这三个菌落都与粪厌氧棒杆菌3 2 56FAA和粪厌氧棒杆菌DSM 14662高度相似，但是在这些已知参考文献中是独特的菌株。它们在分类为粪厌氧棒杆菌同源性的临界同源性范围(>98.5％)内，但SNP距离(>100SNP)将我们的分离株确定为不同于参考菌株3_2_56FAA和DSM 14662的独特菌株。但是，我们的分离株都彼此相同(0SNP)，因此该菌株在本文称为A.caccae_lah。通过CosmosID®的全基因组分析还证实分离物中不存在任何毒力基因，所记录的唯一抗生素抗性基因是对于四环素类的抗生素抗性基因。下表中对此做了进一步描述。

[0160]



[0161] A.caccae_lah的抗生素敏感性用抗生素圆盘周围的生长抑制表征。使冷冻的A.caccae_lah储液的冰片在CMG液体培养基中生长过夜，然后将100μl液体培养基接种到

BHI琼脂上。然后将抗生素圆盘(10μg链霉素、30μg卡那霉素、30μg四环素和10μg氨苄青霉素)放在琼脂上以测量表征抗生素敏感性的清除区域。将平板培养基在厌氧条件下于37℃培育六天。如大的清除半径所示(图16),A.caccae_lah对氨苄青霉素高度敏感。即使它具有四环素抗性基因,它对四环素也有些易感(图16)。

[0162] B.体外发酵

[0163] A.caccae_lah在单一培养物中不能发酵复杂的糖类,但是可以发酵像婴儿配方奶中的简单糖,包括乳糖。使A.caccae_lah储液的冰片在厌氧条件下在CMG液体培养基中于37℃下生长24小时。这种预培养方法用于所有将来的体外发酵实验。然后将10μl预培养物转移到7mL单独或补充有10mg/ml葡萄糖、蔗糖、乳糖、纤维二糖或马铃薯淀粉的最小的蛋白胨酵母(PY)液体培养基中。所有这些PY变化形式都是由厌氧系统在厌氧条件下预还原制备的。48小时后测量生长和丁酸盐产量。如OD600测量的,与补充纤维二糖或马铃薯淀粉相比,A.caccae_lah在PY液体培养基补充有蔗糖、葡萄糖和乳糖时丰度增加。如参考文献61和62中所述,通过HPLC-UV-Vis量化溶液中的丁酸盐。类似于生长,当在蔗糖、葡萄糖或乳糖中生长时,A.caccae_lah产生的丁酸盐最多。这些简单糖与婴儿配方奶中的简单糖类似。为了测试婴儿配方奶中A.caccae_lah的丰度及其丁酸盐产量,A.caccae_lah在补充有Nutramigen®(10mg/ml糖类)或者Enfamil®(10mg/ml糖类)的PY液体培养基中生长,Nutramigen®是一种为CMA婴儿设计的高铁型、低变应原性的婴儿配方奶,Enfamil®是包含牛奶的标准婴儿配方奶。健康的(Enfamil)和CMA(Nutramigen)婴儿供体食用相同的配方奶,并且所有这些由各自微生物组定植的小鼠也食用相同的配方奶。当用Enfamil或Nutramigen作为PY液体培养基生长时,A.caccae_lah的丰度相似,这证明A.caccae_lah并不依赖于消耗牛奶来生长。但是,与单独PY液体培养基相比,在Nutramigen中丁酸盐的产量最高。Nutramigen中的主要糖分是包含果糖和蔗糖的玉米糖浆,这反映了当仅补充有蔗糖时A.caccae_lah的高丁酸盐产量。所有组通过单因素方差分析进行分析。相对于PY,*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。这些结果示于图17。

[0164] A.caccae_lah能够同时使用乳酸盐和乙酸盐来生产丁酸盐。粪厌氧棒杆菌和其他梭菌纲一般认为是纤维发酵菌种,但是从以前的数据中可以看出,单独A.caccae_lah不能消耗复杂纤维来生长或产生丁酸盐。其他组已表明,主要的降解菌即拟杆菌属,分解复杂的纤维并产生代谢物乳酸盐和乙酸盐,这些乳酸盐和乙酸盐可以被梭菌纲菌种消耗产生丁酸盐(59)。为了检验这种复杂的交互营养共生是否可以体外模拟,在PY液体培养基中仅补充这些代谢物来刺激A.caccae_lah产生丁酸盐。生长来自如上所述的冷冻的甘油储液中的A.caccae_lah预培养物,然后将其中的10μl转移到补充有33mM乙酸盐和/或40mM乳酸盐的最小的PY液体培养基中(57)。48小时后测量生长和丁酸盐产量。如图18所示,当补充有两种或任一种代谢物时,A.caccae_lah显著生长。有趣的是,与补充一种相比,该菌株仅在补充有乳酸盐和乙酸盐两者时产生显著高水平的丁酸盐。该数据支持了其他出版物描述的该家族细菌的交叉营养共生机制和代谢循环。所有组均通过单因素方差分析进行分析。相对于PY,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。

[0165] 如图19所示,A.caccae_lah与来自过敏(CMA)婴儿供体的复杂细菌混合物共培养时,由复杂糖类产生明显更多的丁酸盐。A.caccae_lah或人CMA粪便样品(来自人供体6的冷

冻甘油储液)预培养物以如上所述的方式生长。然后将总计10μl(10μl A.caccae_lah,10μl CMA,或5μl A.caccae_lah+5μl CMA)转移到单独或补充有10mg/ml马铃薯淀粉或纤维二糖的最小的PY液体培养基中(厌氧环境)。48小时后测量生长和丁酸盐产量。单一培养的A.caccae_lah在所有三种介质中的生长相似,并且低于在CMA培养中的检测限度。当将A.caccae_lah与CMA细菌混合物共培养时,其丰度与qPCR测量的在单一培养中生长的丰度相似或稍高。这证实A.caccae_lah能够在复杂的共培养中竞争底物并建立生态位。如前所述,单一培养的A.caccae_lah当生长在补充有任一种糖类的培养基中时均不能产生显著的丁酸盐。在仅PY和PY+淀粉中通过CMA培养产生的丁酸盐也很少。然而,当补充有任一糖类,特别是淀粉时,与单独的A.caccae_lah或单独的CMA相比,共培养产生的丁酸盐水平明显更高。有证据表明,马铃薯淀粉可能是好的益生元补充剂,可支持A.caccae_lah在体内的生长和丁酸盐的产生。当补充纤维二糖时,CMA培养和共培养产生的丁酸盐比单独的A.caccae_lah培养多,这表明CMA细菌混合物包含一些能够从纤维分解中产生丁酸盐的物种,并且A.caccae_lah的添加不会向该体系中贡献任何额外的丁酸盐。因此,纤维二糖不是合适的益生元补充剂。

[0166] 发明人确定了CMA定植的储存库小鼠的粪便中的细菌混合物是否会与人类CMA混合物的表现类似,因为这些储存库小鼠的粪便将用于定植所有将来的CMA小鼠。收集先前由CMA供体6定植的储存库小鼠的粪便,在无菌PBS中均质化,然后1:1稀释在50%甘油溶液中,并在-80℃下冷冻在冷冻管中。A.caccae_lah、人CMA微生物群(hCMA)和小鼠CMA微生物群(msCMA)的预培养物按照如上所述的方式制备。然后将预培养物接种到含或不含补充剂的PY液体培养基中,补充剂为单独CMA(10ul),CMA+A.caccae_lah(5ul粪厌氧棒杆菌+5ul CMA),或者单独A.caccae_lah(10ul),且补充剂在24小时后添加。补充剂(Nutramigen,乳酸盐/乙酸盐)以与前述相同的浓度添加,并使用约10mg/ml的麦麸。在t=48h或72h测量生长和丁酸盐的产量,以使在稍后的时间点添加的组中的粪厌氧棒杆菌完整生长48h。正如预期的那样,两种CMA混合物都不含有可测量的粪厌氧棒杆菌。与刚解冻的人CMA粪便相比,CMA储存库小鼠粪便的细菌混合物在基线处产生了更多的丁酸盐,而带有乳酸盐和乙酸盐的A.caccae_lah的添加仍然导致丁酸盐浓度显著增加(图20)。造成这两种CMA来源之间差异的因素很多,包括在转移到小鼠过程中菌种流失、储存库小鼠中丁酸盐产生源的数量随时间增加或在冷冻培养中所用时间存在差异。

[0167] 当以较低丰度体外接种时,A.caccae_lah能够生长。在这一系列实验中,发明人确定当接种丰度比CMA混合物低时,A.caccae_lah是否仍能在共培养物中生长,因为当引入到CMA-定植小鼠中时,粪厌氧棒杆菌的相对丰度要低得多。进行此实验是为了反映将A.caccae_lah引入CMA定植的小鼠比同时进行1:1接种更准确的事实。A.caccae_lah或CMA预培养按照本文所述进行,然后将10μl转移到补充有10mg/ml糖类(10mg/ml糖类Nutramigen,Nutramigen加10mg/ml scFOS(短链低聚果糖,临床益生元)或Nutramigen加LA(40mM乳酸盐+33mM乙酸盐))的最小的PY液体培养基中。将A.caccae_lah和CMA预培养物以多种比例转移到经补充的PY液体培养基或CMG液体培养基中:10ul A.caccae_lah:0ul CMA;5ul A.caccae_lah:5ul CMA;3ul A.caccae_lah:7ul CMA;1ul A.caccae_lah:9ul CMA。如物种特异性qPCR所示,A.caccae_lah的体积并未显著影响其扩增或丁酸盐产量。与单独添加Nutramigen的培养基相比,添加scFOS降低了丁酸盐的总浓度。乳酸盐和乙酸盐的

添加导致最高的丁酸盐浓度。与A.caccae_lah单独培养相比，在该培养基中共培养时的丁酸盐的量较大，而在A.caccae_lah单一培养中，在48h培养基中没有可检测到的乳酸盐或乙酸盐。这表明培养物中的CMA物种为体系贡献了额外的乳酸盐和乙酸盐，这可能允许A.caccae_lah在补充的代谢物耗尽后继续产生丁酸盐。

[0168] 在开始体内定植实验之前，通过qPCR确认并测定粪厌氧棒杆菌在健康的储存库小鼠中存在和在CMA储存库小鼠中不存在。用健康婴儿供体2的粪便定植的储存库小鼠的qPCR显示出可测量的粪厌氧棒杆菌丰度，而用CMA供体6的粪便定植的储存库小鼠则没有显示。发明人预测，向CMA定植的小鼠提供A.caccae_lah和益生元补充剂将使该菌种生长并在宿主中建立生态位。理想地，发明人能够施用A.caccae_lah，以使A.caccae_lah在CMA定植的小鼠中的丰度达到与在健康定植的小鼠中检测的相似水平。

[0169] C.用于初步体内研究的实验计划(图21)

[0170] 在该实验中，发明人旨在验证A.caccae_lah在CMA定植小鼠中的定植及其对益生元补充剂的依赖性。将无菌(GF)C3H/HeN无菌小鼠断奶并喂食Nutramigen。同时，通过灌胃法(I.G.)给小鼠提供CMA储存库小鼠(人供体6)的粪便浆液，以在小鼠模型中建立CMA-微环境。将CMA微生物定植7天。在整个实验过程中，小鼠接受持续供应的Nutramigen。给小鼠自由喂食Nutramigen，加上额外的乳酸盐/乙酸盐或糖类补充剂，可以提供足够的连续底物来帮助粪厌氧棒杆菌定植。从断奶后的第7天开始，小鼠灌胃接受A.caccae_lah和益生元两者或对照。收集粪便后，一组小鼠立即接受100ul PBS(对照)或一种益生元补充剂(10mg/ml乳酸盐加10mg/ml乙酸盐或10mg/ml马铃薯淀粉)。三十分钟后，小鼠接受250ul的活体生物药产品(LBP，即大约1×10^{6}CFU的A.caccae_lah)，或相同体积的在甘油中的无菌CMG液体培养基作为阴性对照。第一周后，停止灌胃LBP，但益生元(或对照)继续施用一周。这是为了确定益生元的施用是否足以在不引入更多细菌的情况下维持小鼠的LBP(A.caccae_lah)种群。在这两个星期内，每天收集粪便，通过qPCR分析A.caccae_lah的丰度，并通过HPLC UV-Vis分析粪便中丁酸盐的浓度。在第42天，或在粪便中未检测到A.caccae_lah丰度的第一时间点，处死小鼠。处死后，测量盲肠丁酸盐，并通过qPCR分析回肠上皮细胞(iIEC)中基因Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot1和Me1的表达。盲肠丁酸盐通常是比粪便丁酸盐更灵敏的度量标准，并且可能是A.caccae_lah体内丁酸盐产量的更好的度量标准，因为结肠中产生的大多数丁酸盐立即被结肠细胞消耗。选择iIEC中的这些特定基因在进行分析，是因为它们是免疫学相关的，并且在健康、CMA和粪厌氧棒杆菌定植的小鼠之间显示出差异表达(参见图4f)。

[0171] 作为另外的实验，发明人可以通过向小鼠灌胃额外递送携带丁酸基团的化合物来增强A.caccae_lah的定植。携带丁酸基团的化合物的实例如在Hubbell等人的PCT申请公开文本WO 2018/195067 A1中所述。如Hubbell等人所述，制备80mg/mL丁酸盐递送聚合物pHPMA-b-pBMA的溶液，并稀释至53.3mg/mL。在上面描述的实验中(第129段)，接受益生元补充剂的小鼠群体在接受益生元补充剂后还立即通过灌胃接受125uL的这种稀释的丁酸盐递送聚合物溶液。实验的其余部分如上所述进行。

[0172] ***

[0173] 根据本公开内容，可以在不进行过度实验下进行和执行本文公开和要求保护的所有方法。尽管本发明的组合物和方法已经根据优选实施方案进行了描述，但是对于本领域技术人员而言显而易见的是，可以对所述方法以及所述方法的步骤或步骤顺序进行调整而

不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地，化学和生理学相关的某些试剂可以显然代替本文所述的试剂，同时获得相同或相似的结果。所有这些对本领域技术人员而言显而易见的类似的替代和修改都被认为落入所附权利要求所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0174] 参考文献

[0175] 以下参考文献在一定程度上为本文所述的内容提供了示例性的程序或其他细节的补充，它们通过具体引用并入本文。

[0176] 1.Sicherer,S.H.,et al.Critical Issues in Food Allergy:A National Academies Consensus Report.Pediatrics(2017).

[0177] 2.Iweala,O.I.&Burks,A.W.Food Allergy:Our Evolving Understanding of Its Pathogenesis,Prevention,and Treatment.Curr Allergy Asthma Rep 16,37(2016).

[0178] 3.Wesemann,D.R.&Nagler,C.R.The Microbiome,Timing,and Barrier Function in the Context of Allergic Disease.Immuity 44,728-738(2016).

[0179] 4.Plunkett,C.H.&Nagler,C.R.The Influence of the Microbiome on Allergic Sensitization to Food.J Immunol 198,581-589(2017).

[0180] 5.Berni Canani,R.,et al.Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants.Isme j 10,742-750(2016).

[0181] 6.Bunyavanich,S.,et al.Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution.J Allergy Clin Immunol 138,1122-1130(2016).

[0182] 7.Stefka,A.T.,et al.Commensal bacteria protect against food allergen sensitization.Proc Natl Acad Sci U S A 111,13145-13150(2014).

[0183] 8.Dominguez-Bello,M.G.,et al.Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns.Proc Natl Acad Sci U S A 107,11971-11975(2010).

[0184] 9.Mueller,N.T.,Bakacs,E.,Combellick,J.,Grigoryan,Z.&Dominguez-Bello,M.G.The infant microbiome development:mom matters.Trends Mol Med 21,109-117(2015).

[0185] 10.Blanton,L.V.,et al.Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children.Science 351(2016).

[0186] 11.Cahenzli,J.,Koller,Y.,Wyss,M.,Geuking,M.B.&McCoy,K.D.Intestinal microbial diversity during early-life colonization shapes long-term IgE levels.Cell Host Microbe 14,559-570(2013).

[0187] 12.Pabst,O.&Mowat,A.M.Oral tolerance to food protein.Mucosal Immunol 5,232-239(2012).

[0188] 13.Honda,K.&Littman,D.R.The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease.Nature 535,75-84(2016).

[0189] 14.Thaiss,C.A.,Zmora,N.,Levy,M.&Elinav,E.The microbiome and innate

immunity.Nature 535,65-74(2016).

[0190] 15.Yanez,A.J.,et al.Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney.J Cell Physiol 197,189-197(2003).

[0191] 16.Ostroukhova,M.,et al.The role of low-level lactate production in airway inflammation in asthma.Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 302,L300-307(2012).

[0192] 17.Zhu,Y.,et al.NPM1 activates metabolic changes by inhibiting FBP1 while promoting the tumorigenicity of pancreatic cancer cells.Oncotarget 6,21443-21451(2015).

[0193] 18.Berger,C.N.,et al.Citrobacter rodentium Subverts ATP Flux and Cholesterol Homeostasis in Intestinal Epithelial Cells In Vivo.Cell Metab(2017).

[0194] 19.Zhang,M.,Zola,H.,Read,L.&Penttila,I.Identification of soluble transforming growth factor-beta receptor III(sTbetaIII)in rat milk.Immunol Cell Biol 79,291-297(2001).

[0195] 20.Miyoshi,H.,Ajima,R.,Luo,C.T.,Yamaguchi,T.P.&Stappenbeck,T.S.Wnt5a potentiates TGF-beta signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury.Science 338,108-113(2012).

[0196] 21.Planer,J.D.,et al.Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice.Nature 534,263-266(2016).

[0197] 22.Schwiertz,A.,et al.Anaerostipes caccae gen.nov.,sp.nov.,a new saccharolytic,acetate-utilising,butyrate-producing bacterium from human faeces.Systematic and applied microbiology 25,46-51(2002).

[0198] 23.Duncan,S.H.,Louis,P.&Flint,H.J.Lactate-utilizing bacteria,isolated from human feces,that produce butyrate as a major fermentation product.Appl Environ Microbiol 70,5810-5817(2004).

[0199] 24.Kurakawa,T.,et al.Diversity of Intestinal Clostridium coccoides Group in the Japanese Population,as Demonstrated by Reverse Transcription-Quantitative PCR.PLoS One 10,e0126226(2015).

[0200] 25.Donohoe,D.R.,et al.The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon.Cell Metab 13,517-526(2011).

[0201] 26.Byndloss,M.X.,et al.Microbiota-activated PPAR-gamma signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion.Science 357,570-575(2017).

[0202] 27.Donohoe,D.R.,Wali,A.,Brylawski,B.P.&Bultman,S.J.Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes.PLoS One 7,e46589(2012).

[0203] 28.Atarashi,K.,et al.Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species.Science 331,337-341(2011).

[0204] 29.Atarashi,K.,et al.Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota.Nature 500,232-236(2013).

[0205] 30.Furusawa,Y.,et al.Commensal microbe-derived butyrate induces differentiation of colonic regulatory T cells.Nature 504,446-450(2013).

[0206] 31.Yano,J.M.,et al.Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis.Cell 161,264-276(2015).

[0207] 32.Kim,Y.G.,et al.Neonatal acquisition of Clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens.Science 356,315-319(2017).

[0208] 33.Noval Rivas,M.,et al.A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis.J Allergy Clin Immunol 131,201-212(2013).

[0209] 34.Caporaso,J.G.,et al.Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms.ISME J 6,1621-1624(2012).

[0210] 35.Caporaso,J.G.,et al.QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.Nat Methods 7,335-336(2010).

[0211] 36.DeSantis,T.Z.,et al.Greengenes,a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB.Appl Environ Microbiol 72,5069-5072(2006).

[0212] 37.Caporaso,J.G.,et al.PyNAST:a flexible tool for aligning sequences to a template alignment.Bioinformatics 26,266-267(2010).

[0213] 38.Edgar,R.C.Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.Bioinformatics 26,2460-2461(2010).

[0214] 39.Oksanen,J.,et al.vegan:Community Ecology Package.R package version 2.4.5.(2017).

[0215] 40.Jiang,L.,et al.Discrete False-Discovery Rate Improves Identification of Differentially Abundant Microbes.mSystems 2(2017).

[0216] 41.Segata,N.,et al.Metagenomic biomarker discovery and explanation.Genome biology 12,R60(2011).

[0217] 42.Bashir,M.E.,Louie,S.,Shi,H.N.＆Nagler-Anderson,C.Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy.J Immunol 172,6978-6987(2004).

[0218] 43.Nik,A.M.＆Carlsson,P.Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme.Biotechniques 55,42-44(2013).

[0219] 44.Andrew,S.FastQC:A quality control application for high throughput sequence data.Babraham Institute Project page:on the world wide web at wwwbioinformaticsbabrahamacuk/projects/fastqc(2016).

[0220] 45.Bray,N.L.,Pimentel,H.,Melsted,P.＆Pachter,L.Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification.Nat Biotechnol 34,525-527(2016).

[0221] 46.Soneson,C.,Love,M.I.＆Robinson,M.D.Differential analyses for RNA-

seq:transcript-level estimates improve gene-level inferences.F1000Res 4,1521 (2015).

[0222] 47.Law,C.W.,Chen,Y.,Shi,W.&Smyth,G.K.voom:Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts.Genome biology 15,R29 (2014).

[0223] 48.Benjamini,Y.&Hochberg,Y.Controlling the False Discovery Rate:a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing.J.R.Statist.Soc.B 57,289-300(1995).

[0224] 49.Yu,G.,Wang,L.G.,Han,Y.&He,Q.Y.clusterProfiler:an R package for comparing biological themes among gene clusters.OMICS 16,284-287(2012).

[0225] 50.Upadhyay,V.,et al.Lymphotoxin regulates commensal responses to enable diet-induced obesity.Nat Immunol 13,947-953(2012).

[0226] 51.Liu,X.,et al.Warburg effect revisited:an epigenetic link between glycolysis and gastric carcinogenesis.Oncogene 29,442-450(2010).

[0227] 52.Roelen,B.A.,Lin,H.Y.,Knezevic,V.,Freund,E.&Mummery,C.L.Expression of TGF-beta s and their receptors during implantation and organogenesis of the mouse embryo.Dev Biol 166,716-728(1994).

[0228] 53.Ellis,J.M.,Bowman,C.E.&Wolfgang,M.J.Metabolic and tissue-specific regulation of acyl-CoA metabolism.PLoS One 10,e0116587(2015).

[0229] 54.Al-Dwairi,A.,Pabona,J.M.,Simmen,R.C.&Simmen,F.A.Cytosolic malic enzyme 1(ME1)mediates high fat diet-induced adiposity,endocrine profile,and gastrointestinal tract proliferation-associated biomarkers in male mice.PLoS One 7,e46716(2012).

[0230] 55.Pinheiro,J.C.&Bates,D.M.Mixed-Effects in Models S and S-Plus, (Springer,New York,2000).

[0231] 56.Kuznetsova,A.,Brockhoff,P.B.,Rune,H.&Christensen,B.lmerTest Package:Tests in Linear Mixed Effects Models.Journal of Statistical Software 82,1-26(2017).

[0232] 57.Moens,F.,et al.Lactate-and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli,bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans.Int J Food Microbiol 241:225-236(2017).

[0233] 58.Rettedal,E.A.,et al.Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria.Nat Commun 5:4714(2014).

[0234] 59.Riviere,A.,et al.Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria:Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut.Front Microbiol 7:979(2016).

[0235] 60.Surana,N.K.and D.L.Kasper Moving beyond microbiome-wide

associations to causal microbe identification.Nature 552(7684):244-247(2017).

[0236] 61.Torii,T.,et al.Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography:specimen stability.Ann Clin Biochem 47(5):447-452(2010).

[0237] 62.Tyagi,A.M.,et al.The Microbial Metabolite Butyrate Stimulates Bone Formation via T Regulatory Cell-Mediated Regulation of WNT10B Expression.Immunity 49(6):1116-1131e1117(2018).

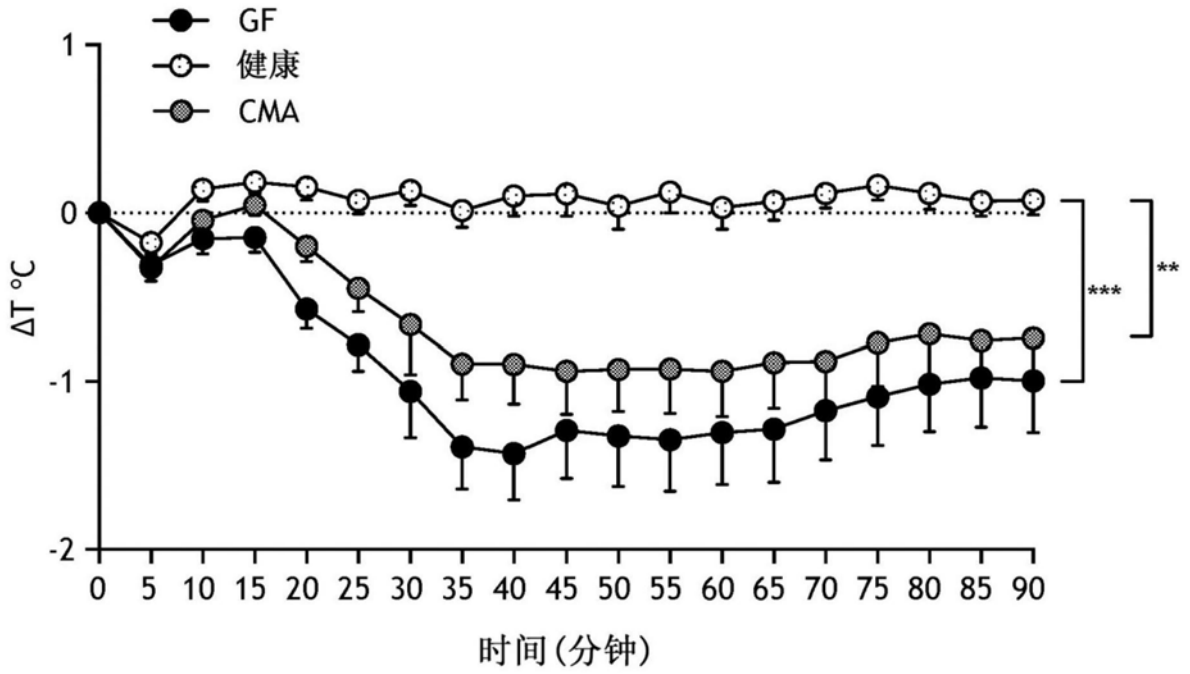

GF
健康
CMA
1
0
-1
-2
ΔT °C
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90
时间(分钟)
***
**

图1A

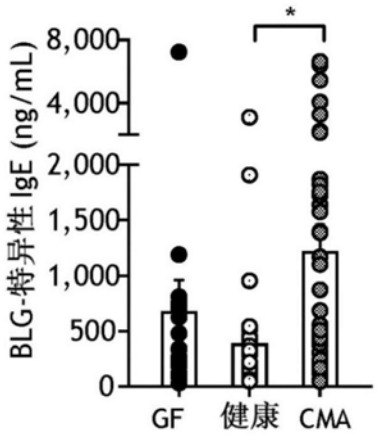

*
8,000
4,000
2,000
1,500
1,000
500
0
BLG-特异性 IgE (ng/mL)
GF
健康
CMA

图1B

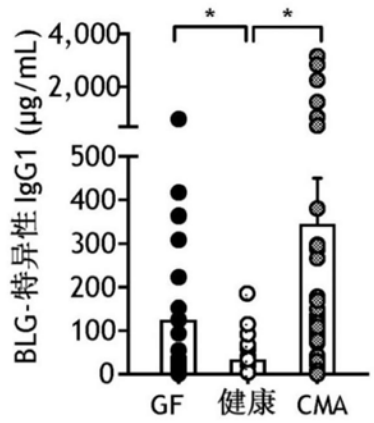

BLG-特异性 IgG1 (μg/mL)
4,000
2,000
500
400
300
200
100
0
*
*
GF
健康
CMA

图1C

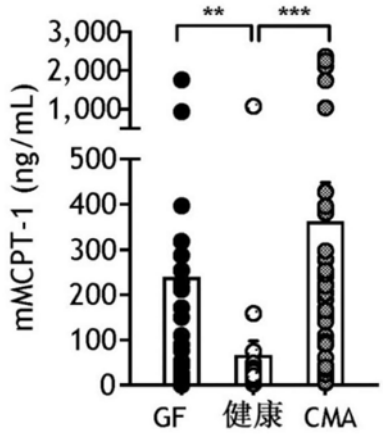

mMCPT-1 (ng/mL)
3,000
2,000
1,000
500
400
300
200
100
0
**
***
GF
健康
CMA

图1D

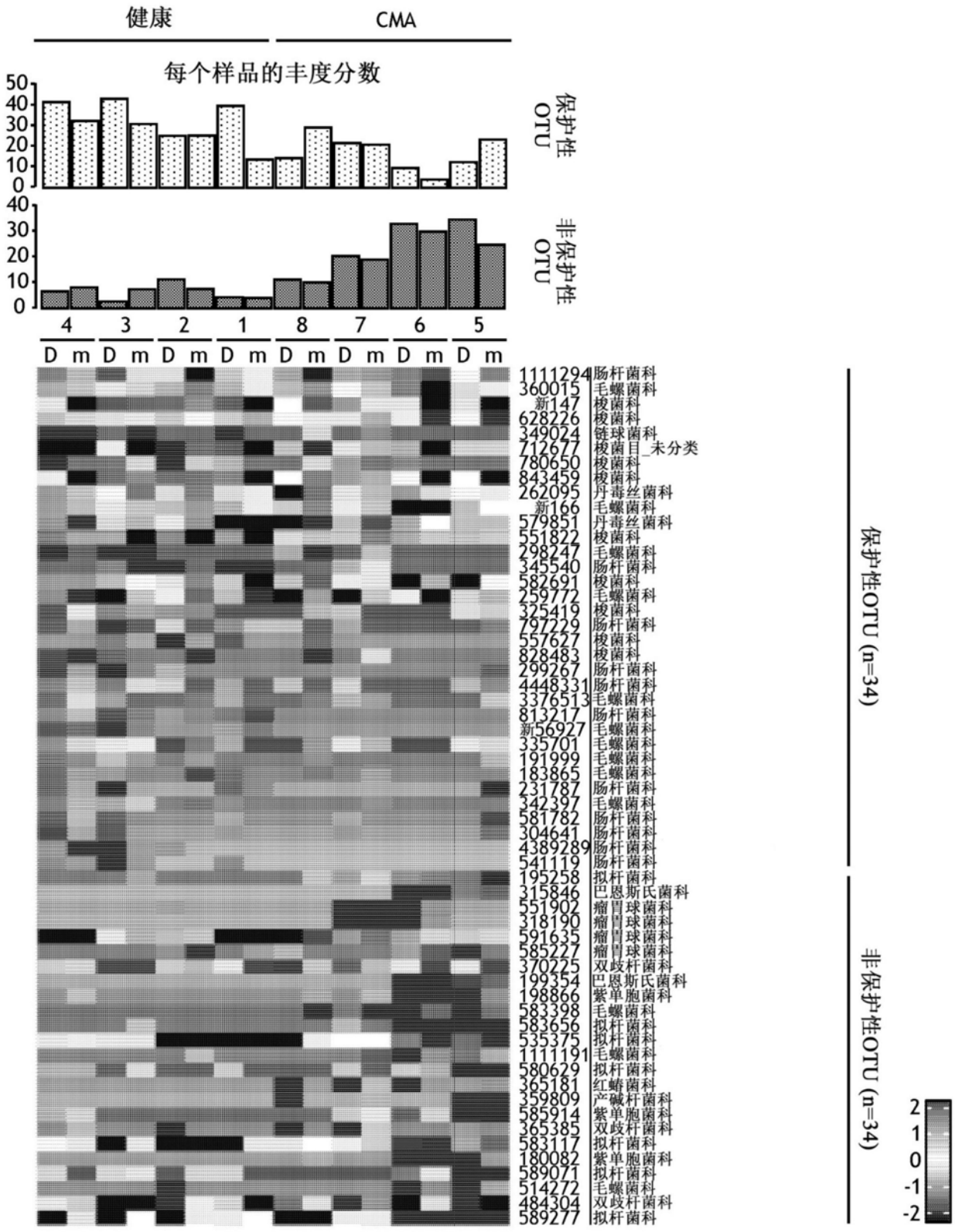

健康
CMA
每个样品的丰度分数
保护性OTU
非保护性OTU
4 3 2 1 8 7 6 5
D m D m D m D m D m D m D m D m
1111294 肠杆菌科
360015 毛螺菌科
新147 梭菌科
628226 梭菌科
349024 链球菌科
712677 梭菌目_未分类
780650 梭菌科
843459 梭菌科
262095 丹毒丝菌科
新166 毛螺菌科
579851 丹毒丝菌科
551822 梭菌科
298247 毛螺菌科
345540 肠杆菌科
582691 梭菌科
259772 毛螺菌科
325419 梭菌科
797229 肠杆菌科
557627 梭菌科
828483 梭菌科
299267 肠杆菌科
4448331 肠杆菌科
3376513 毛螺菌科
813217 肠杆菌科
新56927 毛螺菌科
335701 毛螺菌科
191999 毛螺菌科
183865 毛螺菌科
231787 肠杆菌科
342397 毛螺菌科
581782 肠杆菌科
304641 肠杆菌科
4389289 肠杆菌科
541119 肠杆菌科
195258 拟杆菌科
315846 巴恩斯氏菌科
551902 瘤胃球菌科
318190 瘤胃球菌科
591635 瘤胃球菌科
585227 瘤胃球菌科
370225 双歧杆菌科
199354 巴恩斯氏菌科
198866 紫单胞菌科
583398 毛螺菌科
583656 拟杆菌科
535375 拟杆菌科
1111191 毛螺菌科
580629 拟杆菌科
365181 红蝽菌科
359809 产碱杆菌科
585914 紫单胞菌科
365385 双歧杆菌科
583117 拟杆菌科
180082 紫单胞菌科
589071 拟杆菌科
514272 毛螺菌科
484304 双歧杆菌科
589277 拟杆菌科
保护性OTU (n=34)
非保护性OTU (n=34)
2 1 0 -1 -2

图2A

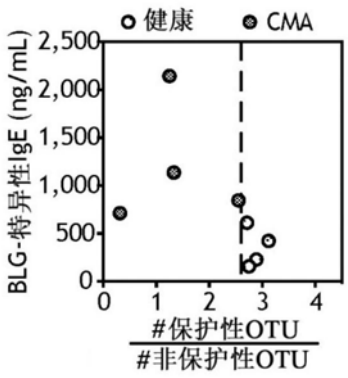

健康
CMA
BLG-特异性IgE (ng/mL)
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
0 1 2 3 4
#保护性OTU
#非保护性OTU

图2B

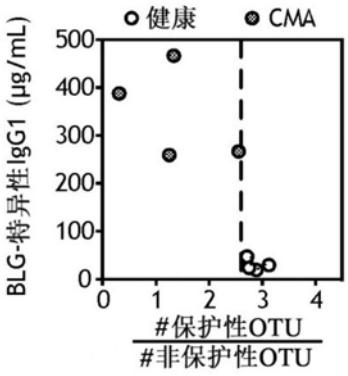

健康
CMA
BLG-特异性IgG1 (μg/mL)
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4
#保护性OTU
#非保护性OTU

图2C

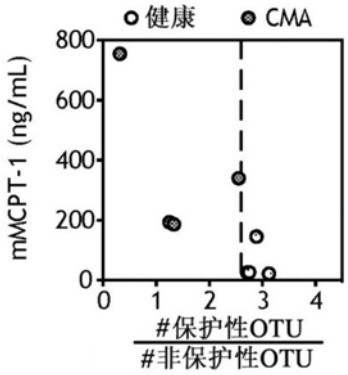

健康
CMA
mMCPT-1 (ng/mL)
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4
#保护性OTU
#非保护性OTU

图2D

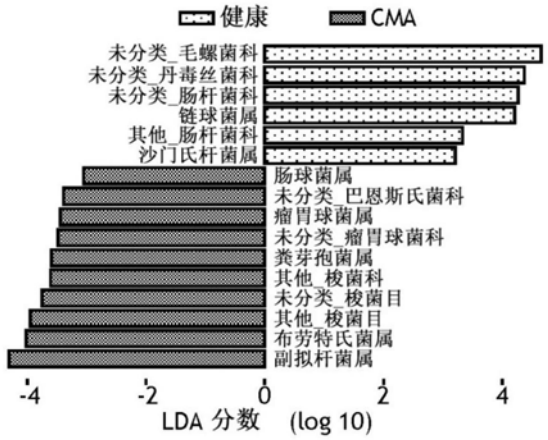

健康
CMA
未分类_毛螺菌科
未分类_丹毒丝菌科
未分类_肠杆菌科
链球菌属
其他_肠杆菌科
沙门氏杆菌属
肠球菌属
未分类_巴恩斯氏菌科
瘤胃球菌属
未分类_瘤胃球菌科
粪芽孢菌属
其他_梭菌科
未分类_梭菌目
其他_梭菌目
布劳特氏菌属
副拟杆菌属
-4
-2
0
2
4
LDA 分数 (log 10)

图2E

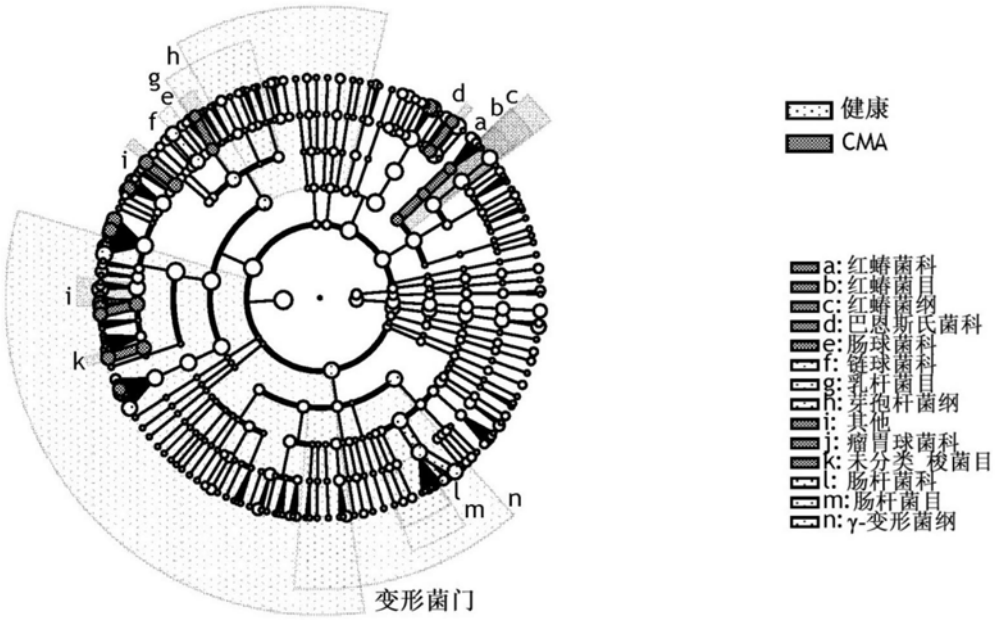

h
g
e
f
i
d
c
b
a
i
k
l
m
n
变形菌门
健康
CMA
a: 红蝽菌科
b: 红蝽菌目
c: 红蝽菌纲
d: 巴恩斯氏菌科
e: 肠球菌科
f: 链球菌科
g: 乳杆菌目
h: 芽孢杆菌纲
i: 其他
j: 瘤胃球菌科
k: 未分类_梭菌目
l: 肠杆菌科
m: 肠杆菌目
n: γ-变形菌纲

图2F

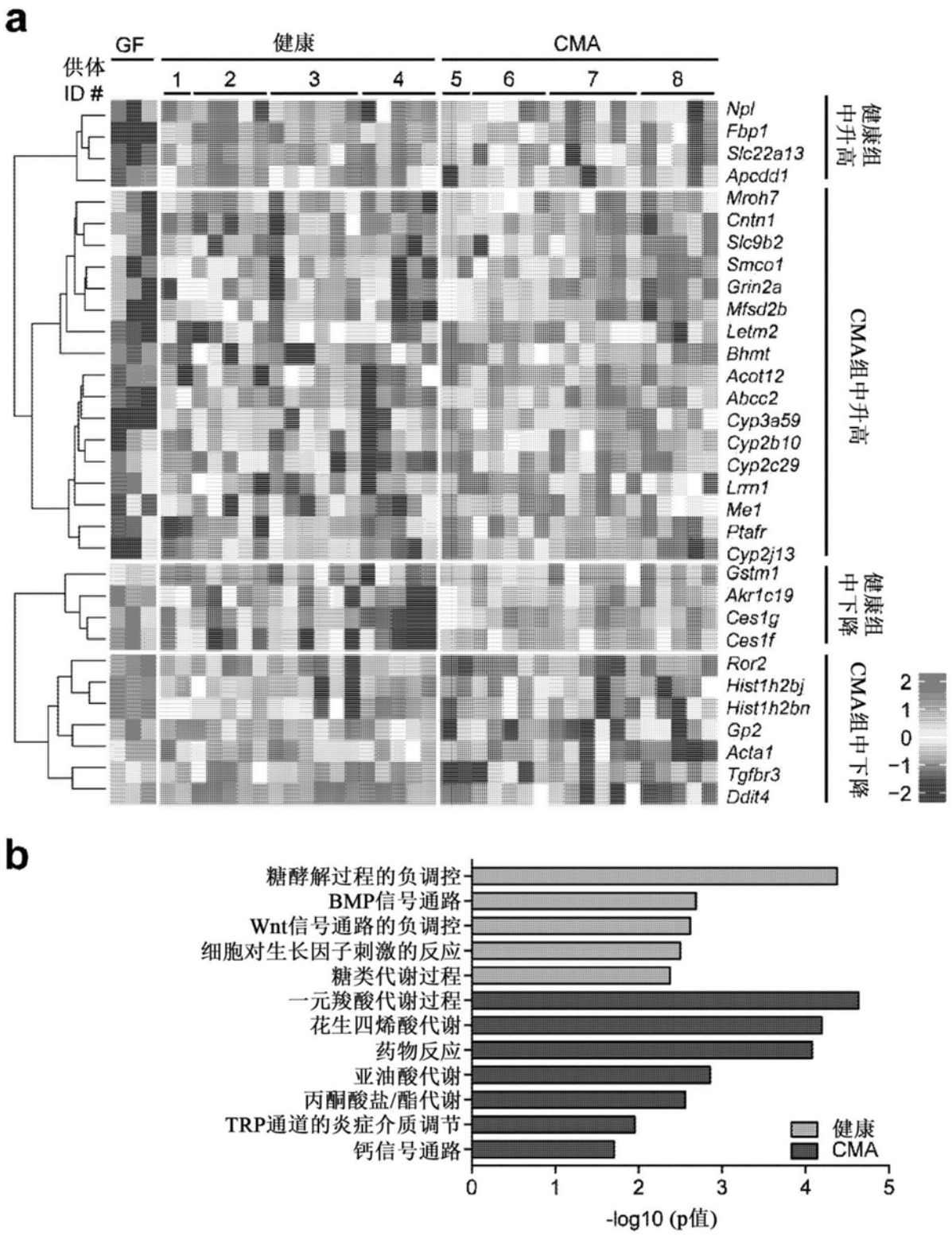

a
GF
健康
CMA
供体
ID #
1
2
3
4
5
6
7
8
Npl
Fbp1
Slc22a13
Apcdd1
Mroh7
Cntn1
Slc9b2
Smco1
Grin2a
Mfsd2b
Letm2
Bhmt
Acot12
Abcc2
Cyp3a59
Cyp2b10
Cyp2c29
Lrrn1
Me1
Ptafr
Cyp2j13
Gstm1
Akr1c19
Ces1g
Ces1f
Ror2
Hist1h2bj
Hist1h2bn
Gp2
Acta1
Tgfbr3
Ddit4
健康组中升高
CMA组中升高
健康组中下降
CMA组中下降
2
1
0
-1
-2
b
糖酵解过程的负调控
BMP信号通路
Wnt信号通路的负调控
细胞对生长因子刺激的反应
糖类代谢过程
一元羧酸代谢过程
花生四烯酸代谢
药物反应
亚油酸代谢
丙酮酸盐/酯代谢
TRP通道的炎症介质调节
钙信号通路
健康
CMA
0
1
2
3
4
5
-log10 (p值)

图3A-B

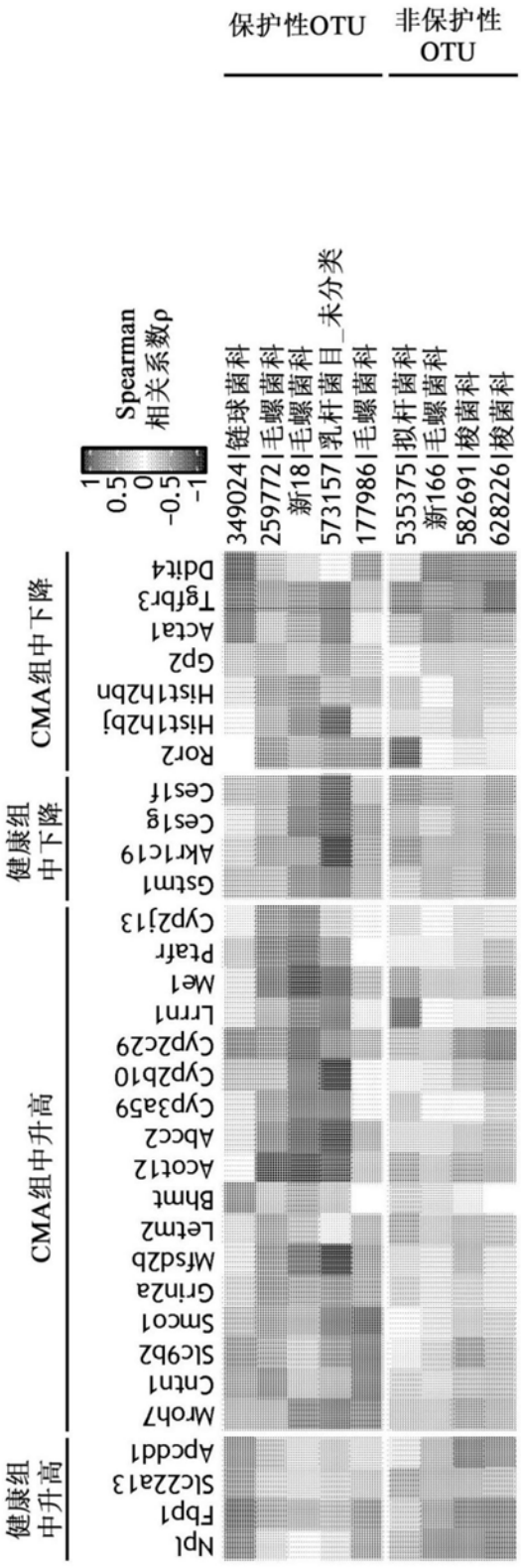

保护性OTU
非保护性OTU
Spearman
相关系数ρ
1
0.5
0
-0.5
-1
349024|链球菌科
259772|毛螺菌科
新18|毛螺菌科
573157|乳杆菌目_未分类
177986|毛螺菌科
535375|拟杆菌科
新166|毛螺菌科
582691|梭菌科
628226|梭菌科
Npl
Fbp1
Slc22a13
Apcddl1
Mroh7
Cntn1
Slc9b2
Smco1
Grin2a
Mfsd2b
Letm2
Bhmt
Acot12
Abcc2
Cyp3a59
Cyp2b10
Cyp2c29
Lrrn1
Me1
Ptafr
Cyp2j13
Gstm1
Akr1c19
Ces1g
Ces1f
Ror2
Hist1h2bj
Hist1h2bn
Gp2
Acta1
Tgfbr3
Ddit4
健康组中升高
CMA组中升高
健康组中下降
CMA组中下降

图4A

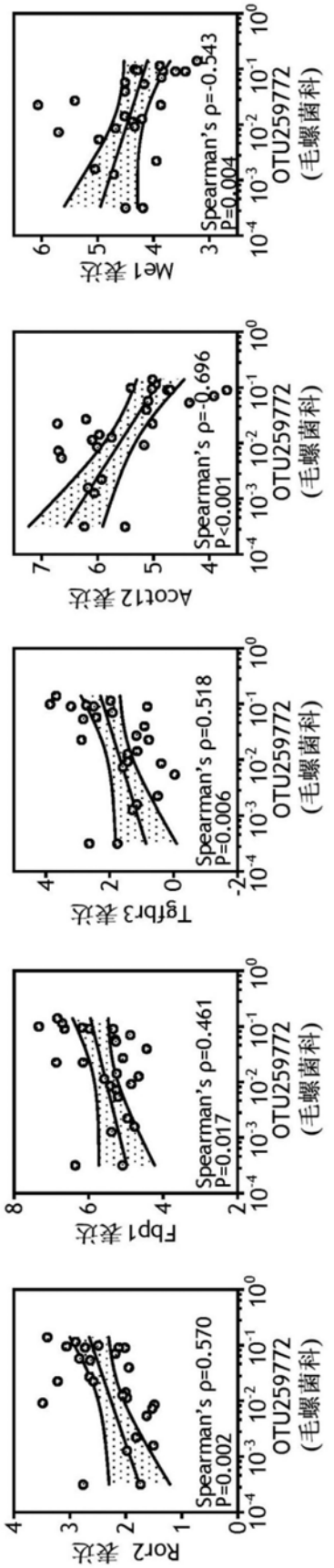

Ror2 表达
Spearman's ρ=0.570
P=0.002
OTU259772
(毛螺菌科)
Fbp1 表达
Spearman's ρ=0.461
P=0.017
OTU259772
(毛螺菌科)
Tgfbr3 表达
Spearman's ρ=0.518
P=0.006
OTU259772
(毛螺菌科)
Acot12 表达
Spearman's ρ=-0.696
P<0.001
OTU259772
(毛螺菌科)
Me1 表达
Spearman's ρ=-0.543
P=0.004
OTU259772
(毛螺菌科)

图4B

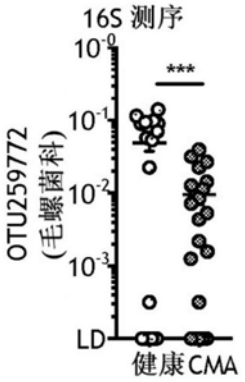

16S 测序
***
OTU259772
(毛螺菌科)
LD
健康 CMA

图4C

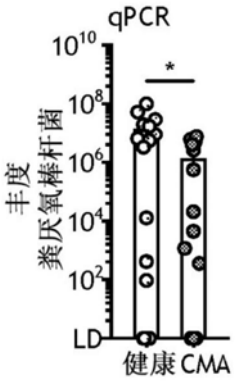

qPCR
*
丰度
粪厌氧棒杆菌
LD
健康 CMA

图4D

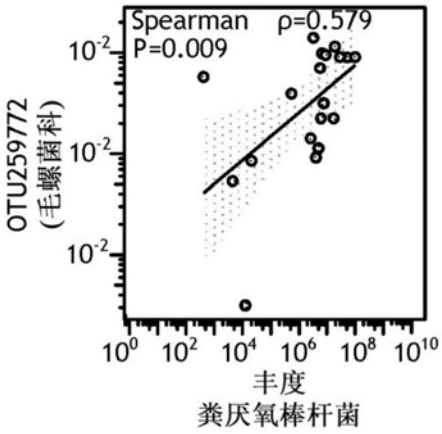

Spearman ρ=0.579
P=0.009
OTU259772
(毛螺菌科)
丰度
粪厌氧棒杆菌

图4E

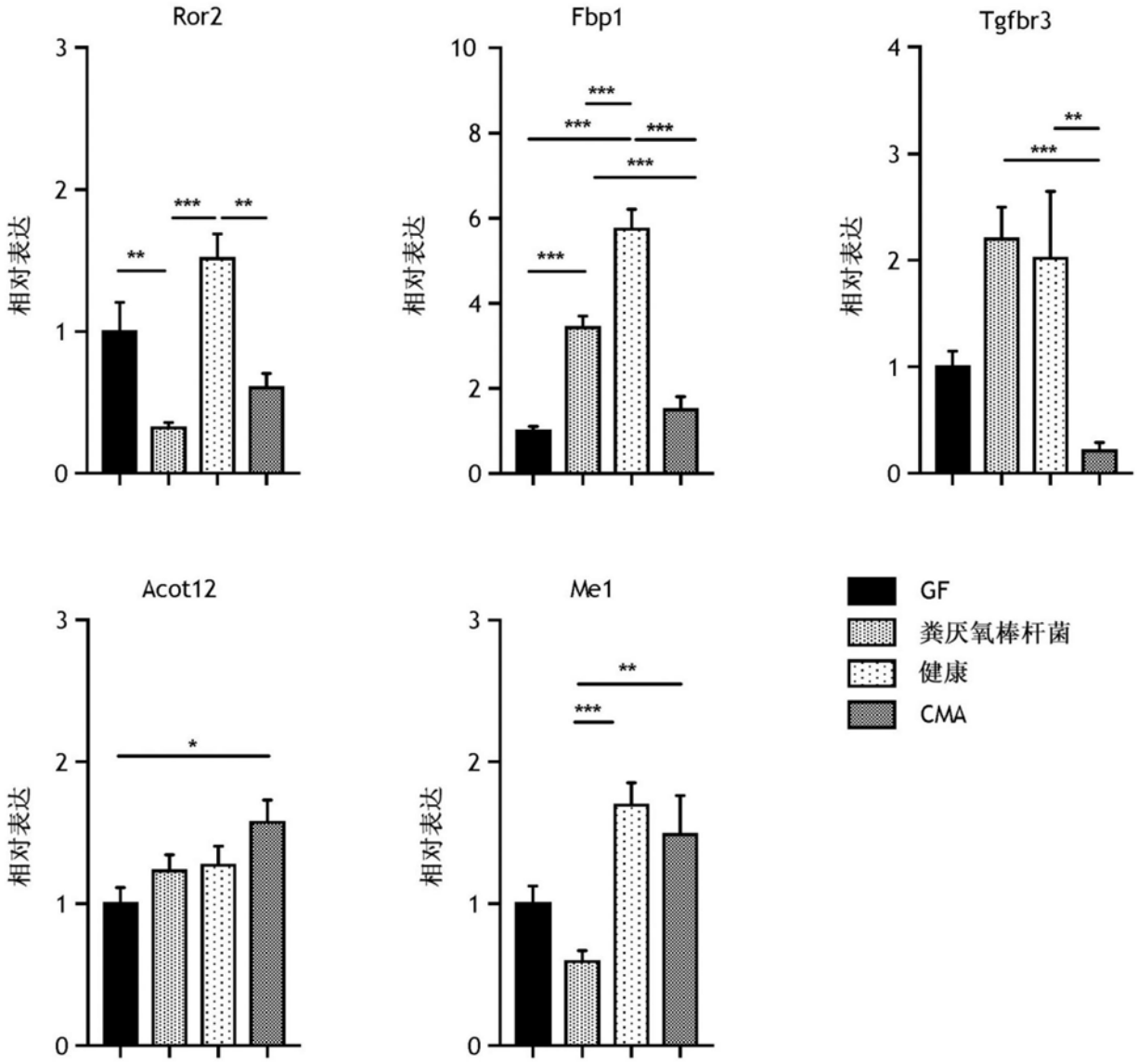


图4F

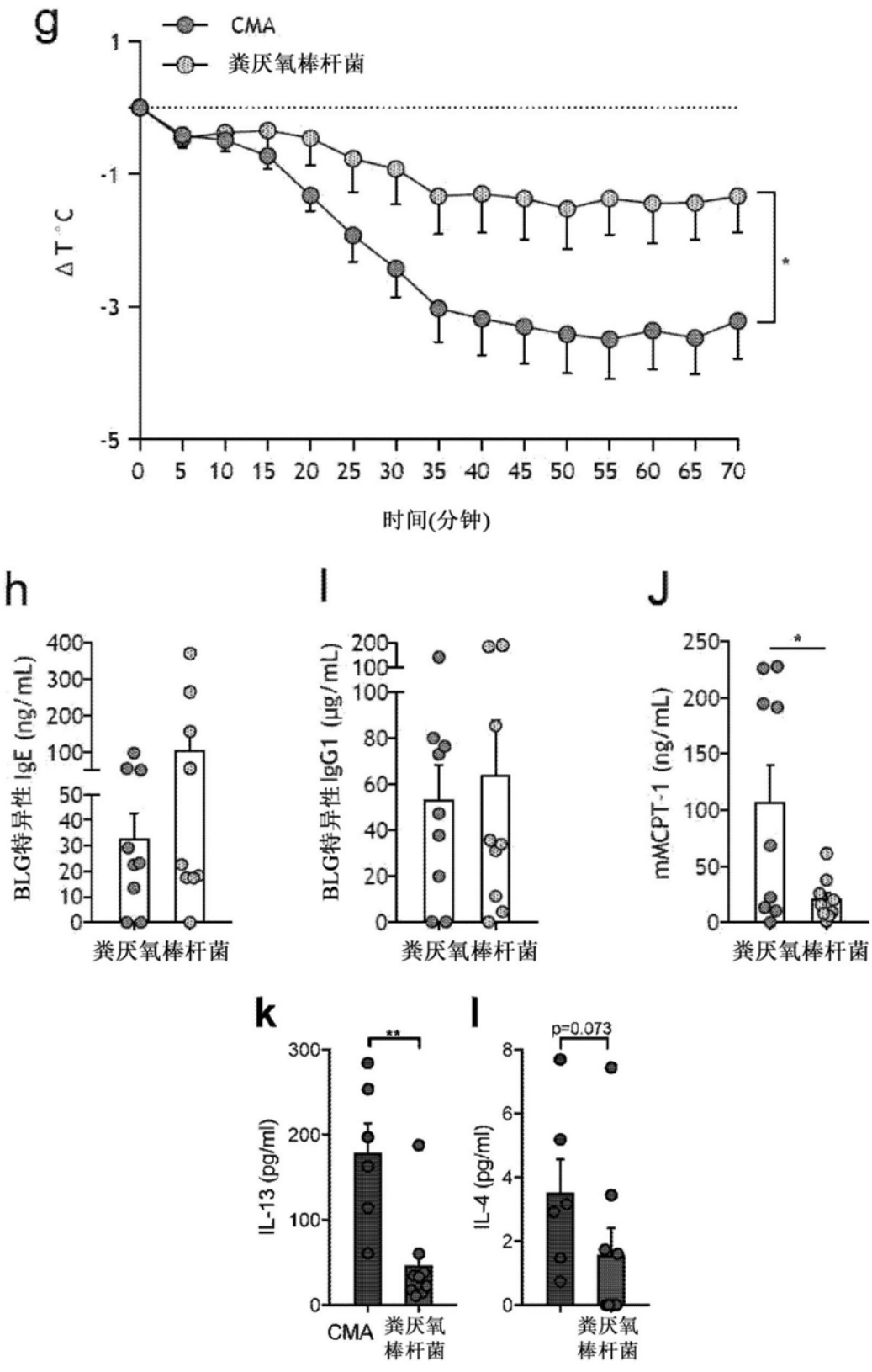

g
CMA
粪厌氧棒杆菌
ΔT°C
1
-1
-3
-5
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
时间(分钟)
*
h
BLG特异性 IgE (ng/mL)
400
300
200
100
50
40
30
20
10
0
粪厌氧棒杆菌
I
BLG特异性 IgG1 (μg/mL)
200
100
100
80
60
40
20
0
粪厌氧棒杆菌
J
mMCPT-1 (ng/mL)
250
200
150
100
50
0
*
粪厌氧棒杆菌
k
IL-13 (pg/ml)
300
200
100
0
**
CMA
粪厌氧棒杆菌
l
IL-4 (pg/ml)
8
6
4
2
0
p=0.073
粪厌氧棒杆菌

图4G-L

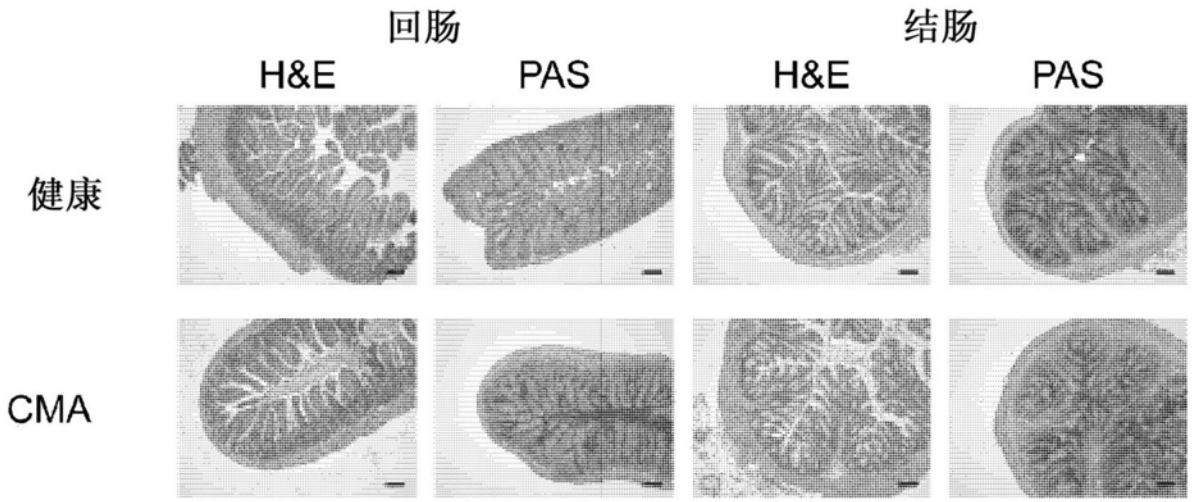


图5

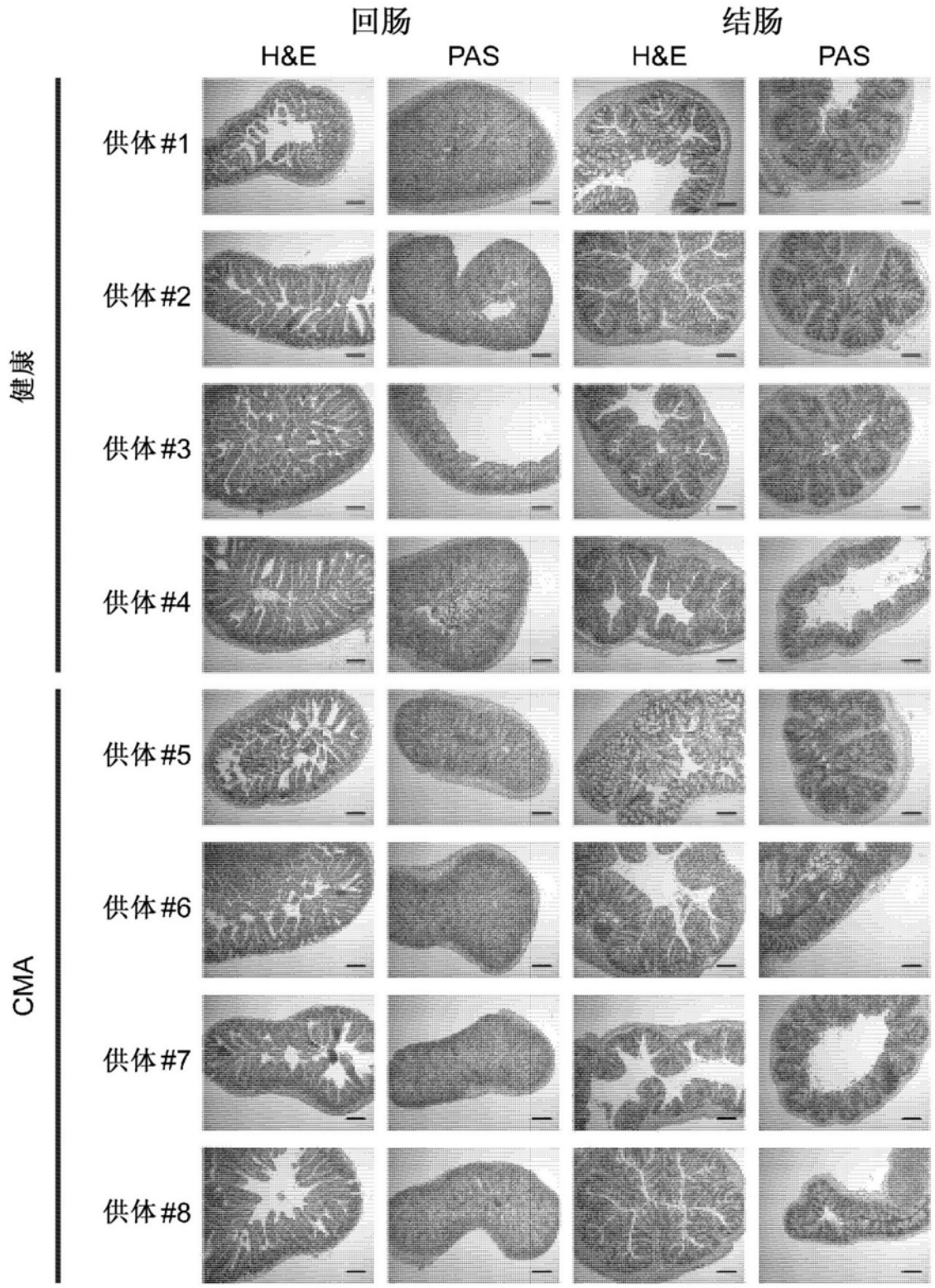


图6

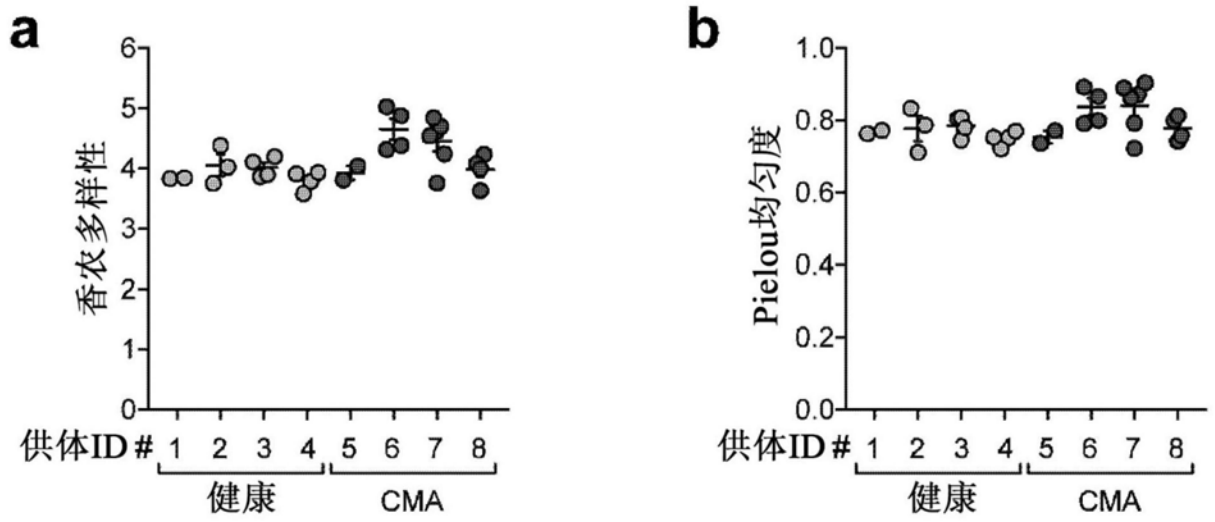

a
香农多样性
0
1
2
3
4
5
6
供体ID#
1 2 3 4 5 6 7 8
健康
CMA
b
Pielou均匀度
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
供体ID#
1 2 3 4 5 6 7 8
健康
CMA

图7A-B

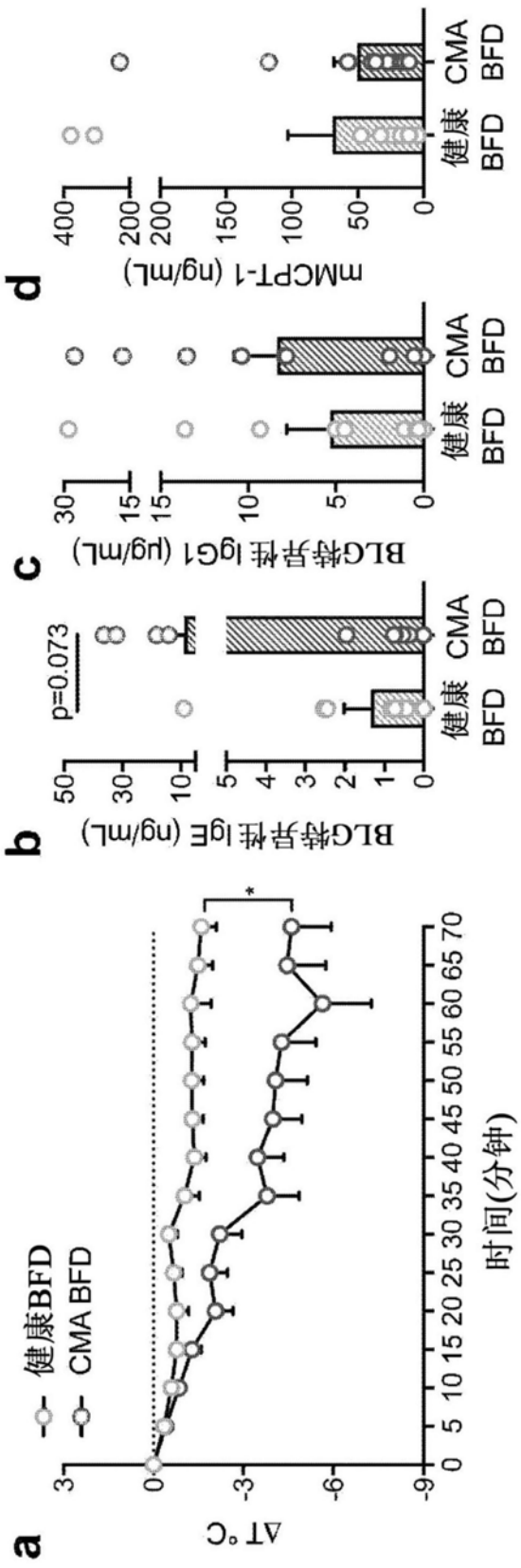

a
ΔT °C
健康BFD
CMA BFD
时间(分钟)
b
BLG特异性IgE (ng/mL)
p=0.073
健康 CMA
BFD BFD
c
BLG特异性IgG1 (μg/mL)
健康 CMA
BFD BFD
d
mMCPT-1 (ng/mL)
健康 CMA
BFD BFD

图8A-D

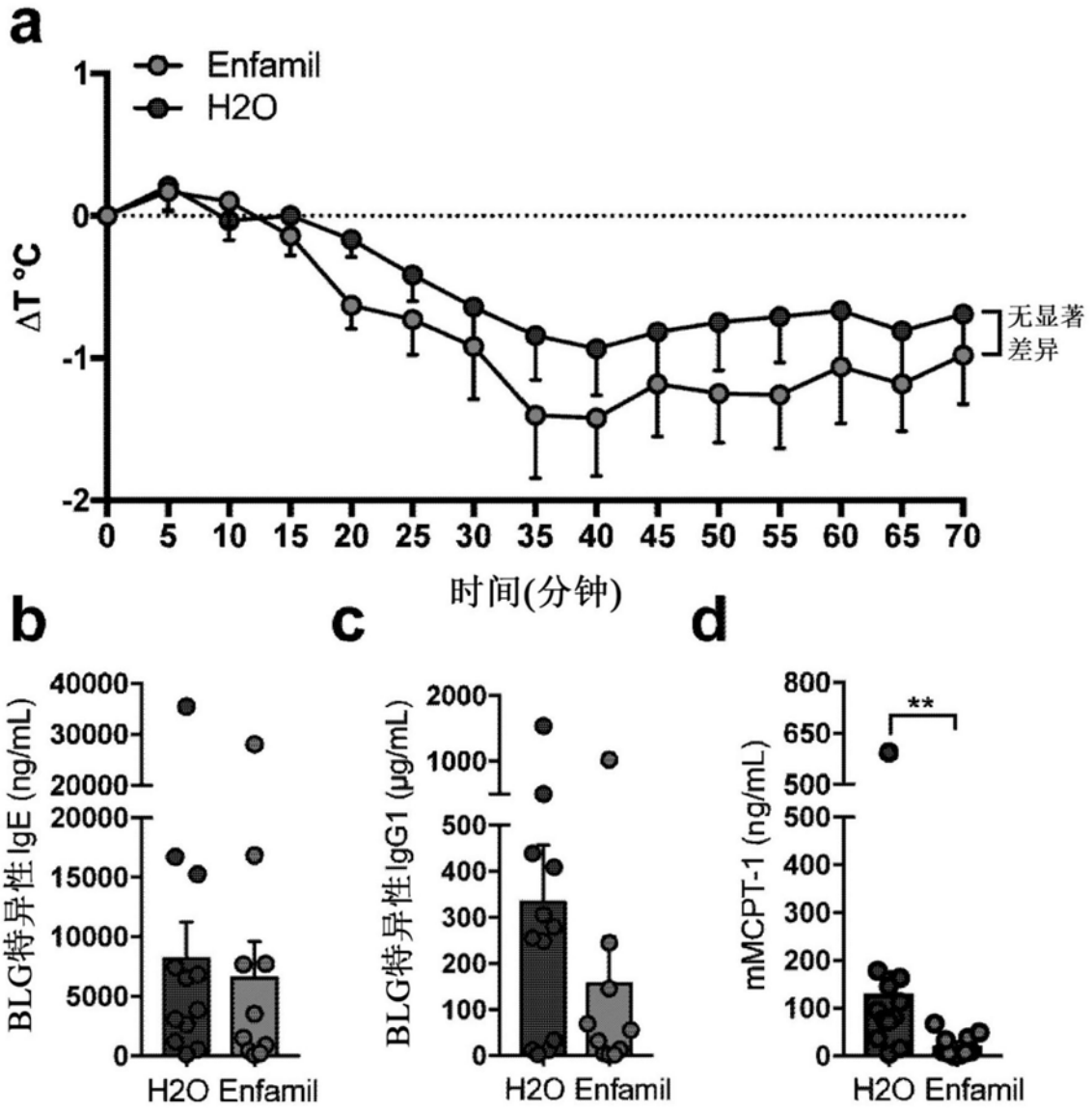

a
Enfamil
H2O
ΔT °C
无显著
差异
时间(分钟)
b
BLG特异性 IgE (ng/mL)
H2O Enfamil
c
BLG特异性IgG1 (μg/mL)
H2O Enfamil
d
mMCPT-1 (ng/mL)
**
H2O Enfamil

图9A-D

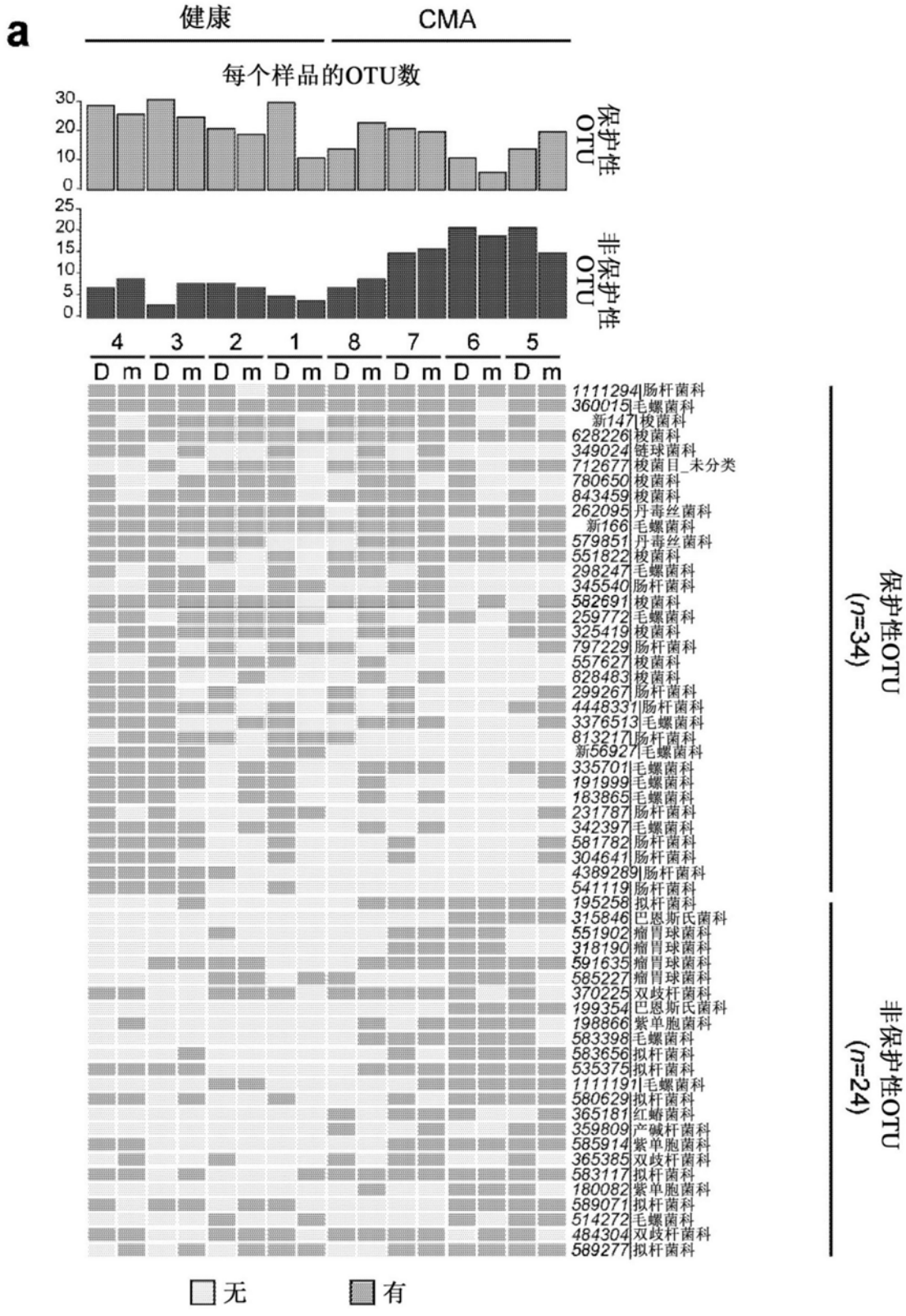

a
健康
CMA
每个样品的OTU数
保护性OTU
非保护性OTU
4 3 2 1 8 7 6 5
D m D m D m D m D m D m D m D m
1111294|肠杆菌科
360015|毛螺菌科
新147|梭菌科
628226|梭菌科
349024|链球菌科
712677|梭菌目_未分类
780650|梭菌科
843459|梭菌科
262095|丹毒丝菌科
新166|毛螺菌科
579851|丹毒丝菌科
551822|梭菌科
298247|毛螺菌科
345540|肠杆菌科
582691|梭菌科
259772|毛螺菌科
325419|梭菌科
797229|肠杆菌科
557627|梭菌科
828483|梭菌科
299267|肠杆菌科
4448331|肠杆菌科
3376513|毛螺菌科
813217|肠杆菌科
新56927|毛螺菌科
335701|毛螺菌科
191999|毛螺菌科
183865|毛螺菌科
231787|肠杆菌科
342397|毛螺菌科
581782|肠杆菌科
304641|肠杆菌科
4389289|肠杆菌科
541119|肠杆菌科
195258|拟杆菌科
315846|巴恩斯氏菌科
551902|瘤胃球菌科
318190|瘤胃球菌科
591635|瘤胃球菌科
585227|瘤胃球菌科
370225|双歧杆菌科
199354|巴恩斯氏菌科
198866|紫单胞菌科
583398|毛螺菌科
583656|拟杆菌科
535375|拟杆菌科
1111191|毛螺菌科
580629|拟杆菌科
365181|红蝽菌科
359809|产碱杆菌科
585914|紫单胞菌科
365385|双歧杆菌科
583117|拟杆菌科
180082|紫单胞菌科
589071|拟杆菌科
514272|毛螺菌科
484304|双歧杆菌科
589277|拟杆菌科
保护性OTU (n=34)
非保护性OTU (n=24)
无
有

图10A

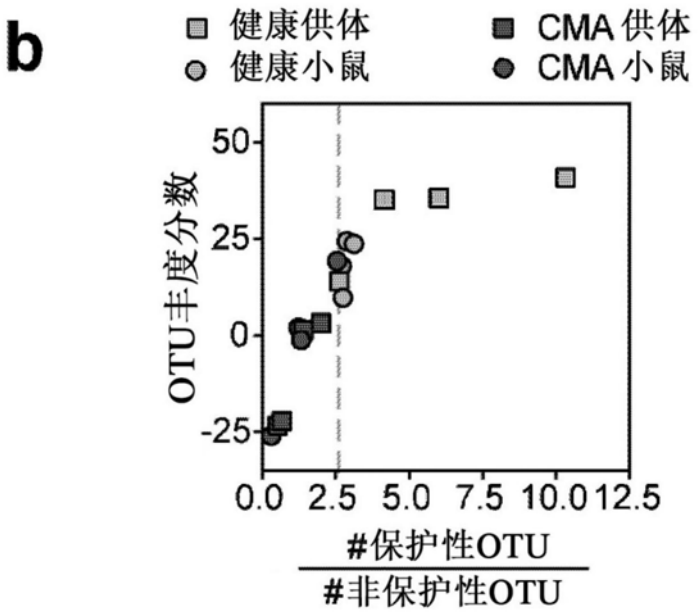

b
健康供体
健康小鼠
CMA 供体
CMA 小鼠
OTU丰度分数
50
25
0
-25
0.0 2.5 5.0 7.5 10.0 12.5
#保护性OTU
#非保护性OTU

图10B

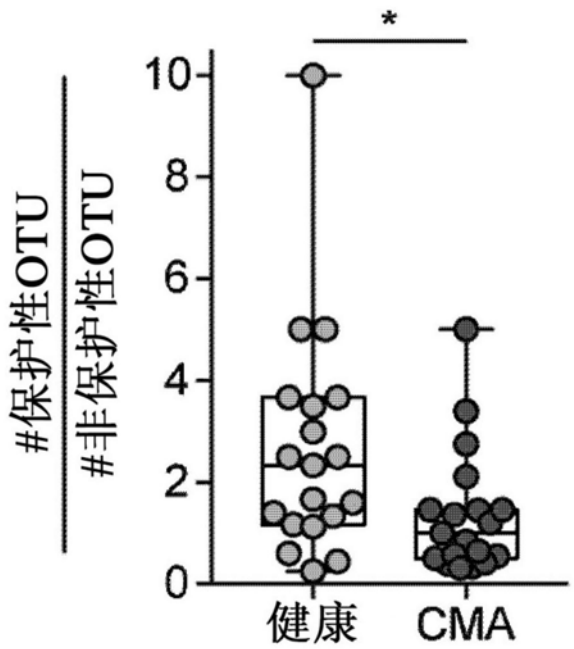

*
#保护性OTU
#非保护性OTU
10
8
6
4
2
0
健康
CMA

图11

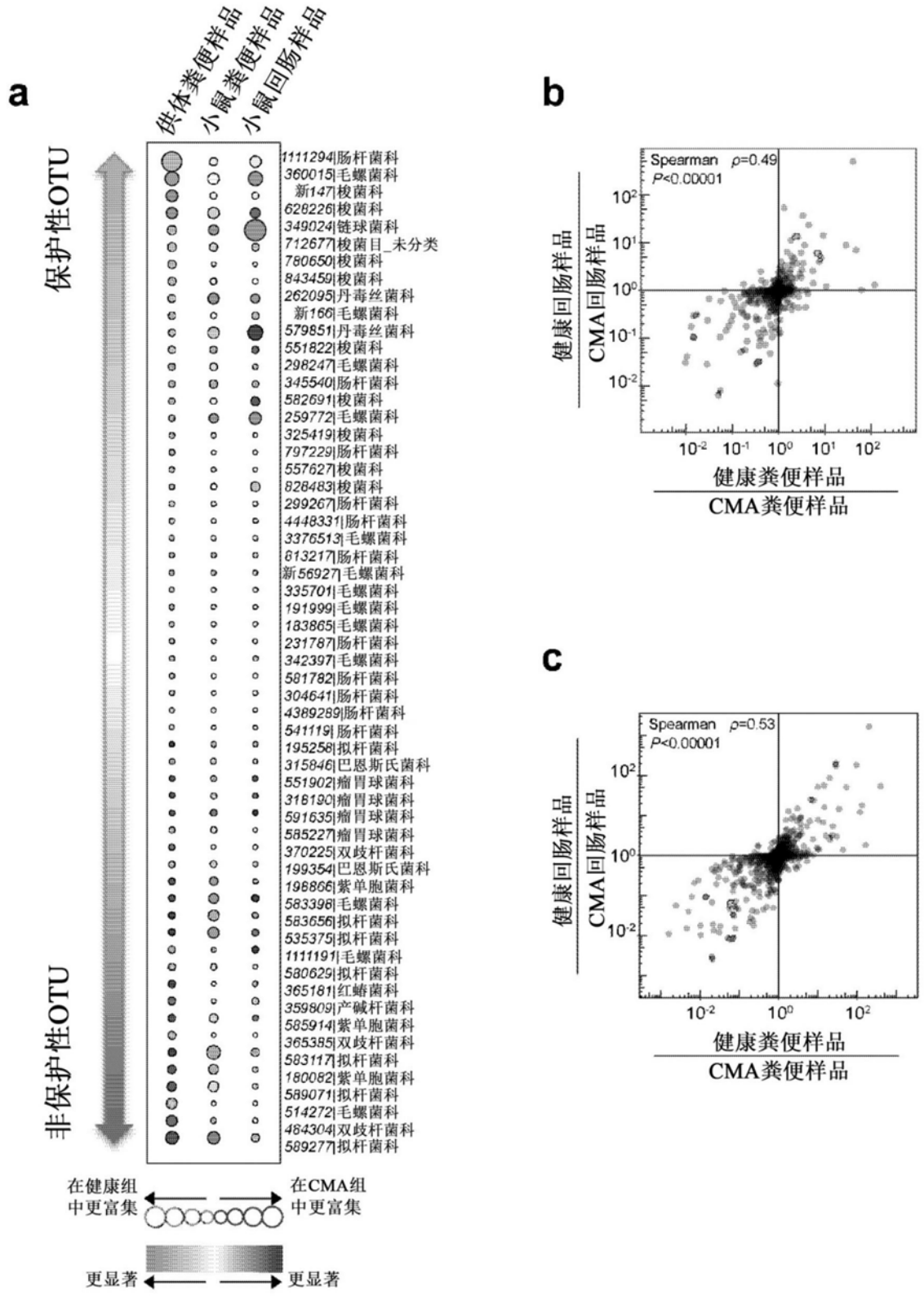

a
供体粪便样品
小鼠粪便样品
小鼠回肠样品
保护性OTU
非保护性OTU
1111294|肠杆菌科
360015|毛螺菌科
新147|梭菌科
628226|梭菌科
349024|链球菌科
712677|梭菌目_未分类
780650|梭菌科
843459|梭菌科
262095|丹毒丝菌科
新166|毛螺菌科
579851|丹毒丝菌科
551822|梭菌科
298247|毛螺菌科
345540|肠杆菌科
582691|梭菌科
259772|毛螺菌科
325419|梭菌科
797229|肠杆菌科
557627|梭菌科
828483|梭菌科
299267|肠杆菌科
4448331|肠杆菌科
3376513|毛螺菌科
813217|肠杆菌科
新56927|毛螺菌科
335701|毛螺菌科
191999|毛螺菌科
183865|毛螺菌科
231787|肠杆菌科
342397|毛螺菌科
581782|肠杆菌科
304641|肠杆菌科
4389289|肠杆菌科
541119|肠杆菌科
195258|拟杆菌科
315846|巴恩斯氏菌科
551902|瘤胃球菌科
318190|瘤胃球菌科
591635|瘤胃球菌科
585227|瘤胃球菌科
370225|双歧杆菌科
199354|巴恩斯氏菌科
198866|紫单胞菌科
583398|毛螺菌科
583656|拟杆菌科
535375|拟杆菌科
1111191|毛螺菌科
580629|拟杆菌科
365181|红蝽菌科
359809|产碱杆菌科
585914|紫单胞菌科
365385|双歧杆菌科
583117|拟杆菌科
180082|紫单胞菌科
589071|拟杆菌科
514272|毛螺菌科
484304|双歧杆菌科
589277|拟杆菌科
在健康组中更富集
在CMA组中更富集
更显著
更显著
b
Spearman ρ=0.49
P<0.00001
健康回肠样品
CMA回肠样品
健康粪便样品
CMA粪便样品
c
Spearman ρ=0.53
P<0.00001
健康回肠样品
CMA回肠样品
健康粪便样品
CMA粪便样品

图12A-C

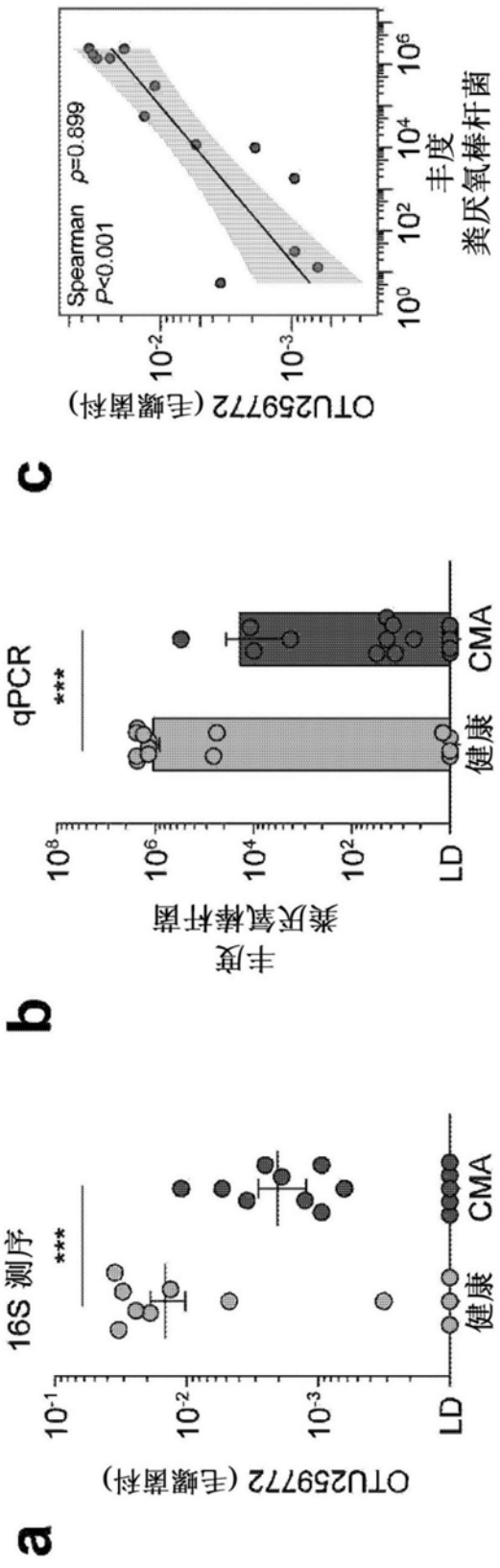

a
16S 测序
***
OTU259772 (毛螺菌科)
健康
CMA
LD
b
qPCR
***
丰度
粪厌氧棒杆菌
健康
CMA
LD
c
OTU259772 (毛螺菌科)
Spearman ρ=0.899
P<0.001
丰度
粪厌氧棒杆菌

图13A-C

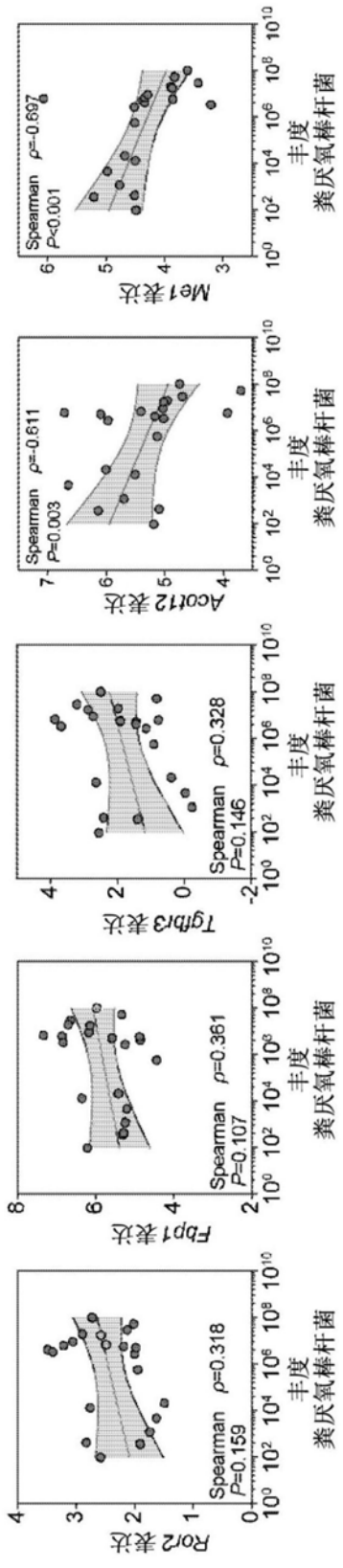

Ror2表达
Spearman ρ=0.318
P=0.159
Fbp1表达
Spearman ρ=0.361
P=0.107
Tgfbr3表达
Spearman ρ=0.328
P=0.146
Acot12表达
Spearman ρ=-0.611
P=0.003
Me1表达
Spearman ρ=-0.697
P<0.001
丰度
粪厌氧棒杆菌

图14

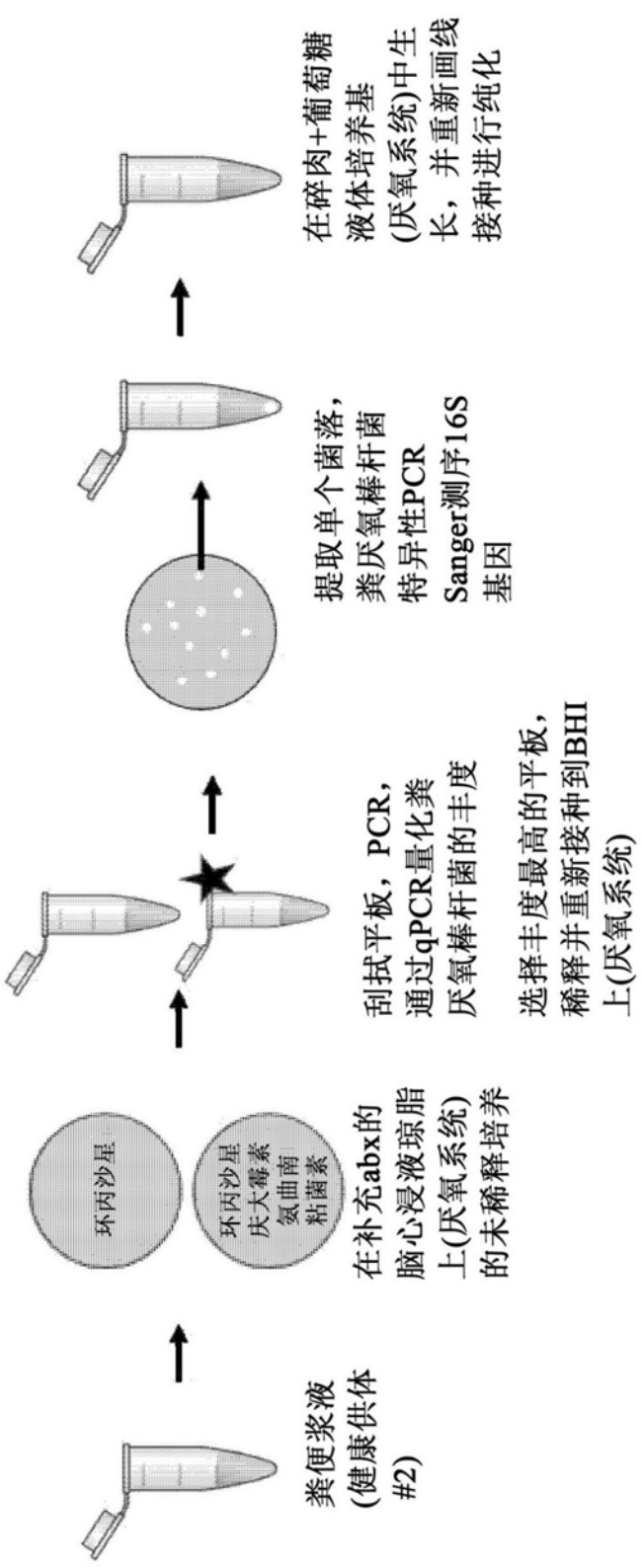

粪便浆液
(健康供体
#2)
环丙沙星
环丙沙星
庆大霉素
氨曲南
粘菌素
在补充abx的
脑心浸液琼脂
上(厌氧系统)
的未稀释培养
刮拭平板，PCR，
通过qPCR量化粪
厌氧棒杆菌的丰度
选择丰度最高的平板，
稀释并重新接种到BHI
上(厌氧系统)
提取单个菌落，
粪厌氧棒杆菌
特异性PCR
Sanger测序16S
基因
在碎肉+葡萄糖
液体培养基
(厌氧系统)中生
长，并重新画线
接种进行纯化

图15

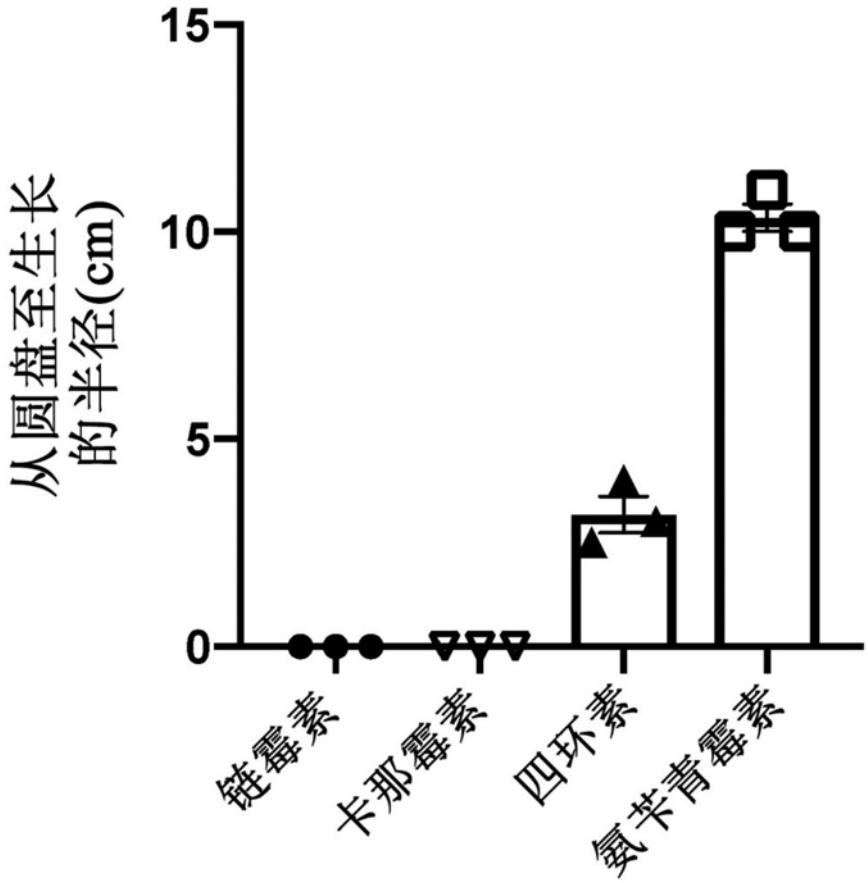


图16

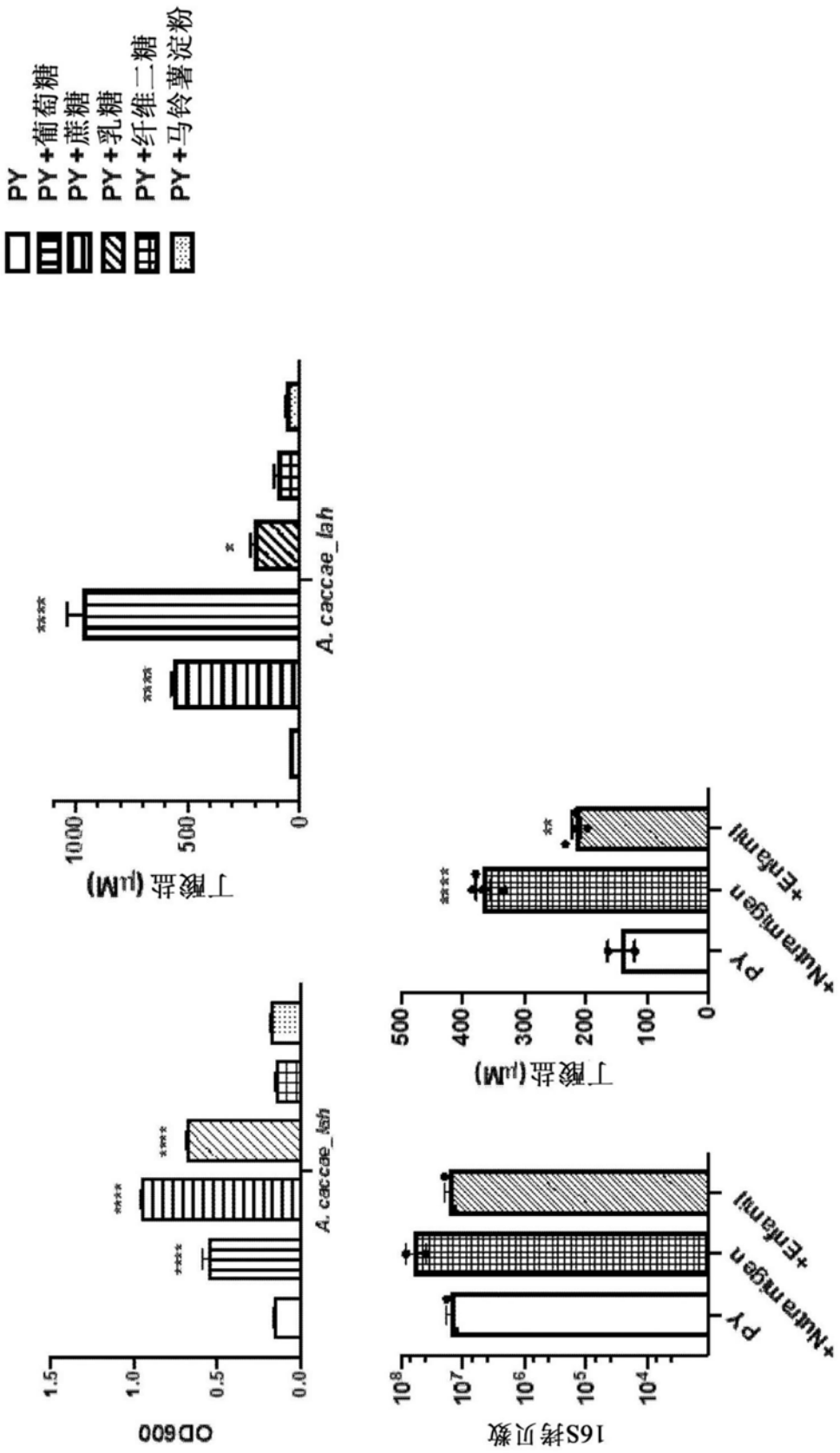

PY
PY+葡萄糖
PY+蔗糖
PY+乳糖
PY+纤维二糖
PY+马铃薯淀粉
OD600
丁酸盐(μM)
A. caccae_lah
16S拷贝数
PY
+Nutramigen
+Enfamil

图17

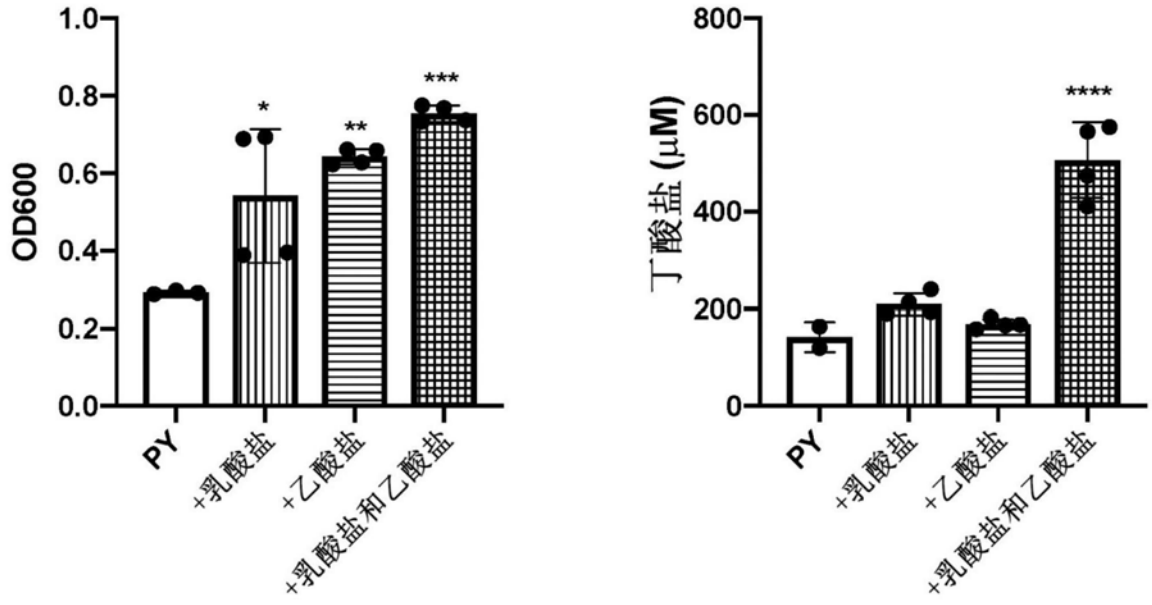

OD600
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
**
***
PY
+乳酸盐
+乙酸盐
+乳酸盐和乙酸盐
丁酸盐 (μM)
800
600
400
200
0
****
PY
+乳酸盐
+乙酸盐
+乳酸盐和乙酸盐

图18

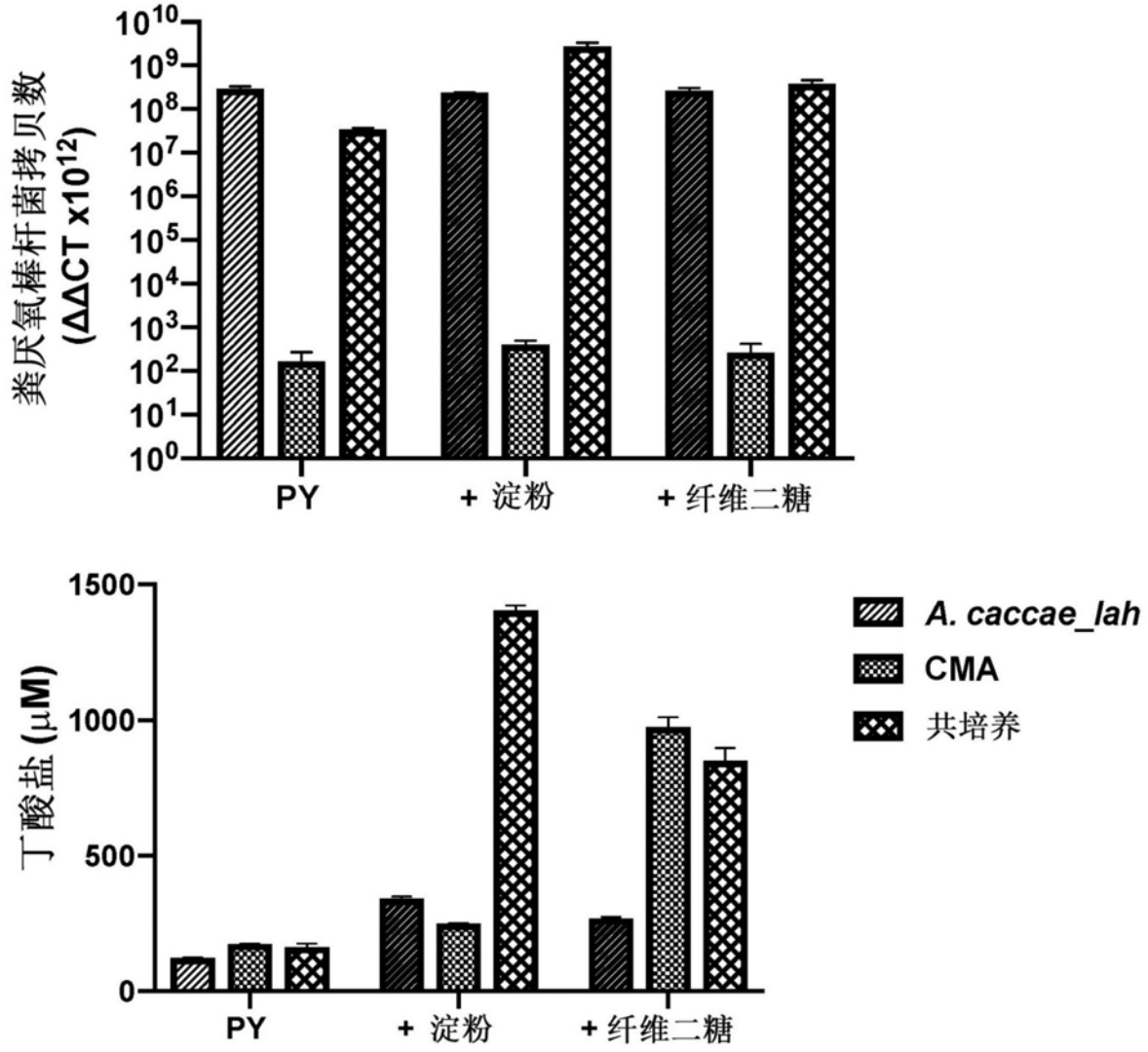

粪厌氧棒杆菌拷贝数
(ΔΔCT x10^12)
10^10
10^9
10^8
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
PY
+ 淀粉
+ 纤维二糖
丁酸盐 (μM)
1500
1000
500
0
PY
+ 淀粉
+ 纤维二糖
A. caccae_lah
CMA
共培养

图19

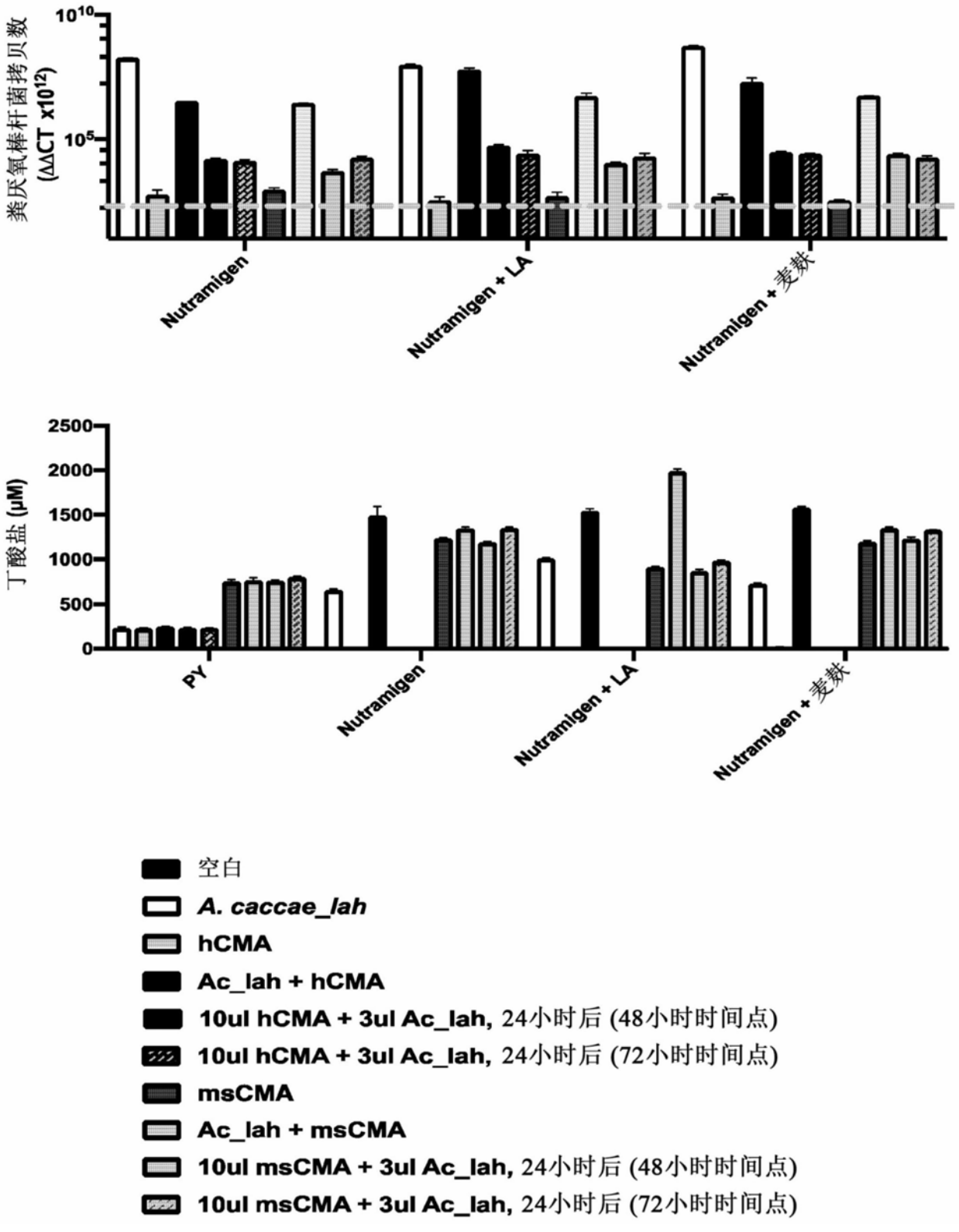

粪厌氧棒杆菌拷贝数
(ΔΔCT x10^12)
10^10
10^5
Nutramigen
Nutramigen + LA
Nutramigen + 麦麸
丁酸盐 (μM)
2500
2000
1500
1000
500
0
PY
Nutramigen
Nutramigen + LA
Nutramigen + 麦麸
空白
A. caccae_lah
hCMA
Ac_lah + hCMA
10ul hCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (48小时时间点)
10ul hCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (72小时时间点)
msCMA
Ac_lah + msCMA
10ul msCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (48小时时间点)
10ul msCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (72小时时间点)

图20A

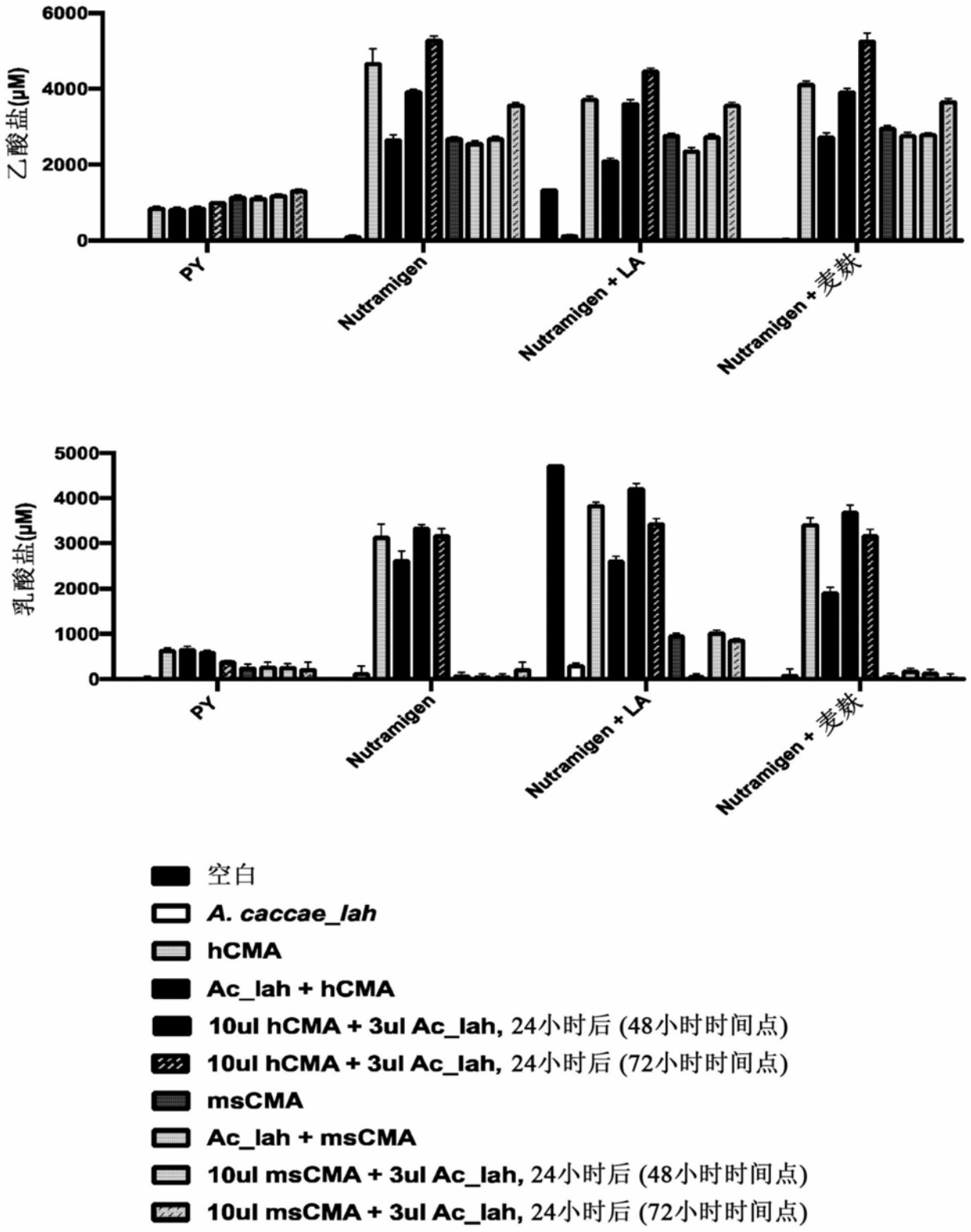

6000
4000
2000
0
乙酸盐(μM)
PY
Nutramigen
Nutramigen + LA
Nutramigen + 麦麸
5000
4000
3000
2000
1000
0
乳酸盐(μM)
PY
Nutramigen
Nutramigen + LA
Nutramigen + 麦麸
空白
A. caccae_lah
hCMA
Ac_lah + hCMA
10ul hCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (48小时时间点)
10ul hCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (72小时时间点)
msCMA
Ac_lah + msCMA
10ul msCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (48小时时间点)
10ul msCMA + 3ul Ac_lah, 24小时后 (72小时时间点)

图20B

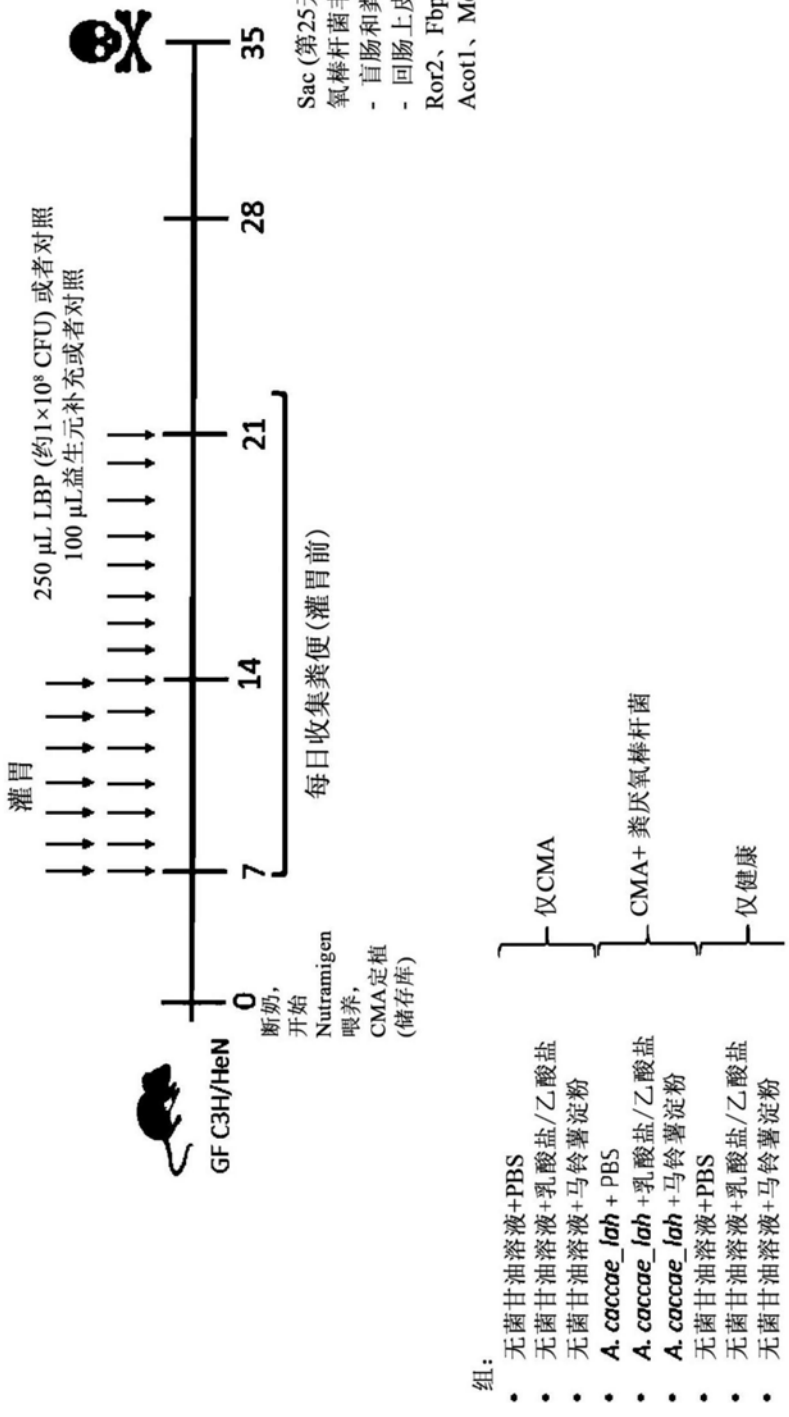

灌胃
250 μL LBP (约1×10⁸ CFU) 或者对照
100 μL益生元补充或者对照
每日收集粪便(灌胃前)
GF C3H/HeN
0
7
14
21
28
35
断奶，开始Nutramigen喂养，CMA定植(储存库)
Sac (第25天或者当粪厌氧棒杆菌丰度=>0)：
- 盲肠和粪便中丁酸盐
- 回肠上皮细胞的qPCR：Ror2、Fbp1、Tgfbr3、Acot1、Me1
组：
• 无菌甘油溶液+PBS
• 无菌甘油溶液+乳酸盐/乙酸盐
• 无菌甘油溶液+马铃薯淀粉
• A. caccae_lah + PBS
• A. caccae_lah +乳酸盐/乙酸盐
• A. caccae_lah +马铃薯淀粉
• 无菌甘油溶液+PBS
• 无菌甘油溶液+乳酸盐/乙酸盐
• 无菌甘油溶液+马铃薯淀粉
仅CMA
CMA+ 粪厌氧棒杆菌
仅健康

图21