



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116529355 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202180050162.4

(22) 申请日 2021.08.12

(30) 优先权数据

10-2020-0102564 2020.08.14 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2021/010768 2021.08.12

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/035269 KO 2022.02.17

(83) 生物保藏信息

KCTC14230BP 2020.07.07

KCTC14231BP 2020.07.07

(71) 申请人 Ko生物技术有限公司

地址 韩国首尔特别市

(72) 发明人 徐普揽 全庆灿 金云基 南泰旭
金德允 高光杓

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

专利代理师 钟海胜 宋琴芝

(51) Int. Cl.

G12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

G12P 19/14 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

权利要求书3页 说明书21页

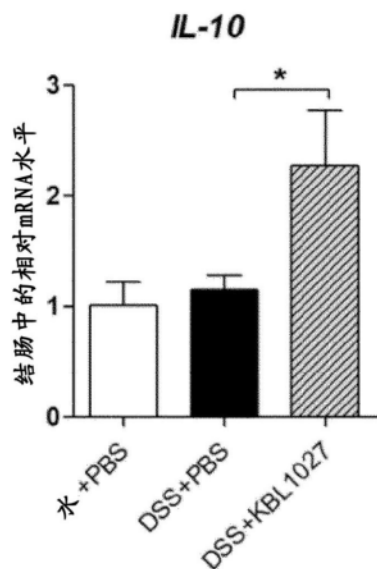
序列表5页 附图9页

(54) 发明名称

普氏栖粪杆菌菌株及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种普氏栖粪杆菌 (Faecaliberium prausnitzii) 菌株及其用途。



1. 普氏栖粪杆菌 (*Faecaliberium prausnitzii*) KBL1027 菌株, 其保藏编号为 KCTC14231BP。

2. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株的16S rRNA序列由SEQ ID NO:4表示。

3. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株产生胞外多糖。

4. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株包含在细胞壁和荚膜中起作用的基因。

5. 根据权利要求4所述的菌株, 其中, 在细胞壁和荚膜中起作用的基因执行胞外多糖生物合成或含鼠李糖聚糖的功能。

6. 根据权利要求4所述的菌株, 其中, 在细胞壁和荚膜中起作用的基因包含选自由以下(1)至(7)组成的组中的一种或多种基因:

(1) 胞外多糖生物合成糖基转移酶,

(2) 酪氨酸蛋白激酶,

(3) α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶,

(4) α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶,

(5) 荚膜多糖生物合成蛋白,

(6) 脂蛋白释放系统ATP结合蛋白,

(7) 假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一萆醇葡萄糖醛酸基转移酶。

7. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株包含选自由以下(1)至(13)组成的组中的一种或多种基因:

(1) 胞外多糖生物合成糖基转移酶,

(2) 酪氨酸蛋白激酶,

(3) α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶,

(4) α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶,

(5) 荚膜多糖生物合成蛋白,

(6) 脂蛋白释放系统ATP结合蛋白,

(7) 假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一萆醇葡萄糖醛酸基转移酶,

(8) N-乙酰葡萄糖胺利用的预测转录调节因子, GntR家族,

(9) 膜结合的溶胞胞壁质转糖苷酶B,

(10) 肌苷-尿苷偏好核苷水解酶,

(11) LysR家族转录调节因子,

(12) 阳离子流出系统蛋白,

(13) 钴锌镉抗性蛋白。

8. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株具有诱导抗炎性细胞因子产生的性质。

9. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株具有增强肠上皮细胞之间紧密连接的性质。

10. 根据权利要求1所述的菌株, 其中, 所述菌株具有改善肠道微生物平衡的性质。

11. 根据权利要求10所述的菌株, 其中, 所述改善肠道微生物平衡是选自由以下(1)至(5)组成的组中的一种或多种:

(1) 诱导动物肠道菌群多样性的增加,

(2) 改善动物肠道菌群的失衡,

(3) 诱导动物肠道菌群中普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和/或普雷沃氏菌科 (*Paraprevotellaceae*) 菌株的相对丰度增加,

(4) 防止动物肠道菌群中具有脂多糖细胞壁的有害细菌的相对丰度增加,

(5) 防止动物肠道菌群中变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 和/或变形菌门菌株的相对丰度增加。

12. 根据权利要求1所述的菌株,其中,所述菌株具有选自由以下(1)至(2)组成的组中的一种或多种特征:

(1) 防止因炎性疾病导致的体重减轻,

(2) 防止因炎性疾病导致的肠道长度减少。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖。

14. 一种用于预防、改善或治疗炎性疾病的组合物,其包含选自由根据权利要求1至12中任一项所述的菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物和菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述炎性疾病是选自由炎性肠病、炎性皮肤病、炎性胶原血管病、特应性皮炎、过敏性疾病、自身免疫性疾病、自身免疫性炎性疾病、湿疹、哮喘、过敏性哮喘、支气管哮喘、鼻炎、过敏性鼻炎、结膜炎、过敏性结膜炎、食物过敏、类风湿性关节炎、风湿热、狼疮、系统性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、哮喘、古兰-巴雷综合征、重症肌无力、皮炎、多发性肌炎、多发性硬化、自身免疫性脑脊髓炎、结节性多动脉炎、桥本甲状腺炎、颞动脉炎,小儿糖尿病、斑秃、天疱疮、口疮性口炎、自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病、干燥综合征、艾迪生病、白塞氏病、水肿、结膜炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、慢性鼻窦炎、喉咙痛、扁桃体炎、支气管炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、结肠炎、痛风、湿疹、痤疮、接触性皮炎、脂溢性皮炎、强直性脊髓炎、纤维肌痛、骨关节炎、肩周炎、肌腱炎、腱鞘炎、肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、败血症、血管炎和滑囊炎组成的组中的一种或多种。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中,所述炎性肠病是选自由炎性结肠直肠病、溃疡性结肠炎 (UC)、肠炎、肠易激综合征 (IBS) 和克罗恩病 (CD) 组成的组中的一种或多种。

17. 根据权利要求14所述的组合物,其中,所述炎性疾病的预防、改善或治疗由所述菌株的胞外多糖所引起。

18. 一种用于预防或改善炎性疾病的食品组合物,其包含选自由根据权利要求1至12中任一项所述的菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物和菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

19. 一种用于预防或改善炎性疾病的益生元组合物,其包含选自由根据权利要求1至12中任一项所述的菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物和菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

20. 一种用于改善肠道微生物平衡的组合物,其包含选自由根据权利要求1至12中任一项所述的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物和菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

21. 一种具有抗炎活性的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖,

其中,所述菌株是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,保藏编号为KCTC14231BP。

22.一种产生具有抗炎活性的物质的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖,

其中,所述菌株是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,保藏编号为KCTC14231BP。

23.根据权利要求22所述的菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖,其中,所述具有抗炎活性的物质是胞外多糖。

普氏栖粪杆菌菌株及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种普氏栖粪杆菌(*Faecaliberium prausnitzii*)菌株及其用途。

背景技术

[0002] 健康的人体内共存着大约100万亿个微生物,是人体细胞数量的十倍。它们的基因数量是人类的100多倍,肠道菌群对每个个体和每种疾病都有独特的结构。健康的肠道共生微生物群与人体细胞有复杂的相互作用,并发挥多种功能,包括通过调节新陈代谢和免疫应答来发展免疫系统,以及维持肠道内稳态。

发明内容

[0003] 技术问题

[0004] 本发明的一种实施方式是提供一种普氏栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0005] 本发明的另一实施方式是提供一种组合物,其包含选自由普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

[0006] 本发明的另一实施方式是提供一种具有炎症性疾病治疗或预防功效的普氏栖粪杆菌菌株用于预防、改善或治疗炎症性疾病的用途。

[0007] 本发明的另一实施方式是提供具有抗炎活性的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖。

[0008] 本发明的另一实施方式是提供具有抗炎活性的物质,例如,产生胞外多糖的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物,或源自该菌株的物质(例如诱导抗炎性细胞因子分泌的胞外多糖)。

[0009] 为了实现上述目的,本发明发现了分离自健康韩国人的新型普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,并证实了与常规普氏栖粪杆菌菌株相比,抗炎性细胞因子产生和炎症性疾病症状改善的优异功效。

[0010] 技术方案

[0011] 本发明的一种实施方式涉及一种普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0012] 本发明的另一实施方式涉及具有抗炎活性的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖。

[0013] 本发明的另一实施方式涉及产生胞外多糖的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖。胞外多糖可以是具有抗炎活性的物质。

[0014] 本发明的另一实施方式涉及一种组合物,其包含选自由普氏栖粪杆菌菌株、菌株

的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。

[0015] 所述组合物可以是用于预防、改善或治疗炎症性疾病的组合物。

[0016] 所述组合物可以是食品组合物或益生元组合物。

[0017] 所述组合物可以是用于改善肠道微生物平衡的组合物。

[0018] 在下文中,将更详细地描述本发明。

[0019] 本发明的一种实施方式涉及一种普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0020] 该菌株可用于抗炎、用于诱导抗炎性细胞因子、用于加强肠上皮细胞之间的紧密连接、用于改善肠道微生物平衡,或用于预防、改善、缓解或治疗炎症性疾病。

[0021] 普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

[0022] 在本申请的实例中,作为比较属于同一物种的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株和普氏栖粪杆菌DSM17677菌株的平均核苷酸同一性(ANI)的结果,尽管它们属于相同物种,但它们表现出较低的平均核苷酸同一性。这意味着根据本发明的一种实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株是具有与常规普氏栖粪杆菌微生物不同遗传特征的新菌株。

[0023] 例如,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株与普氏栖粪杆菌DSM17677菌株可具有小于100%、99%或更少、98%或更少、97%或更少、96%或更少、95%或更少、94%或更少、93%或更少、92%或更少、91%或更少、90%或更少、89%或更少、88%或更少、87%或更少、86%或更少或85%或更少的平均核苷酸同一性(ANI)。本领域技术人员可以清楚地实施与普氏栖粪杆菌DSM17677菌株具有较低平均核苷酸同一性的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,即使未指定平均核苷酸同一性的下限,并且平均核苷酸同一性的下限可以是5%或更多、10%或更多、20%或更多、30%或更多、40%或更多、50%或更多、60%或更多、70%或更多、或80%,但不限于此。

[0024] 在本发明的实例中,作为对普氏栖粪杆菌KBL1027菌株进行比较基因组分析的结果,相比于与该菌株属于同一物种的普氏栖粪杆菌DSM17677菌株,存在许多对普氏栖粪杆菌KBL1027具有特异性的基因。这意味着根据本发明的一种实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株是具有与常规普氏栖粪杆菌微生物具有不同遗传特征的新菌株。

[0025] 例如,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可包含在细胞壁和荚膜中起作用的基因。在细胞壁和荚膜中起作用的基因可能发挥胞外多糖生物合成或含鼠李糖聚糖的功能。例如,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可包含选自由以下(1)至(7)组成的组中的一种或多种基因:

[0026] (1) 胞外多糖生物合成糖基转移酶EpsF(EC 2.4.1.-)

[0027] (2) 酪氨酸蛋白激酶EpsD(EC 2.7.10.2)

[0028] (3) α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶(EC 2.4.1.-)rgpA

[0029] (4) α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶(EC 2.4.1.-)rgpB

[0030] (5) 荚膜多糖生物合成蛋白

[0031] (6) 脂蛋白释放系统ATP结合蛋白Lo1D

[0032] (7) 假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一萆醇葡萄糖醛酸基转移酶TuaG

[0033] 例如,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可包含选自由以下(1)至(13)组成的组中的一种或多种基因:

- [0034] (1) 胞外多糖生物合成糖基转移酶EpsF (EC 2.4.1.-)
- [0035] (2) 酪氨酸蛋白激酶EpsD (EC 2.7.10.2)
- [0036] (3) α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶 (EC 2.4.1.-) rgpA
- [0037] (4) α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶 (EC 2.4.1.-) rgpB
- [0038] (5) 荚膜多糖生物合成蛋白
- [0039] (6) 脂蛋白释放系统ATP结合蛋白Lo1D
- [0040] (7) 假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一萘醇葡萄糖醛酸基转移酶TuaG
- [0041] (8) N-乙酰葡萄糖胺利用的预测转录调节因子, GntR家族NagQ
- [0042] (9) 膜结合的溶胞胞壁质转糖苷酶B (EC 3.2.1.-)
- [0043] (10) 肌苷尿苷偏好核苷水解酶 (EC 3.2.2.1)
- [0044] (11) LysR家族转录调节因子YnfL
- [0045] (12) 阳离子流出系统蛋白CusA
- [0046] (13) 钴锌镉抗性蛋白CzcA
- [0047] 根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可具有抗炎特性, 特别地, 它可以通过诱导抗炎性细胞因子产生而具有抗炎特性。
- [0048] 根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可诱导抗炎性细胞因子产生。例如, 当LPS和菌株一起给药时, 与单独给药LPS的对照组相比, 抗炎性细胞因子产量 (pg/mL) 可以为超过1倍、1.5倍或更多、2倍或更多、2.5倍或更多、3倍或更多、3.5倍或更多、4倍或更多、超过4倍、4.1倍或更多、4.2倍或更多、4.3倍或更多、4.4倍或更多、或4.5倍或更多。抗炎性细胞因子可以是IL-10。
- [0049] 抗炎性细胞因子IL-10是一种免疫调节细胞因子, 在炎症反应、肿瘤形成、过敏和自身免疫性疾病中发挥重要作用。具体而言, IL-10是在各种细胞中产生的重要免疫调节细胞因子, 并且它不仅抑制炎症反应, 还起到调节各种免疫细胞 (例如T细胞、B细胞、NK (自然杀伤) 细胞、抗原呈递细胞、肥大细胞等) 的增殖和分化的作用。IL-10还表现出免疫激活功能, 以去除感染性或非感染性颗粒, 同时最小化炎症反应。此外, IL-10抑制与过敏反应相关的大多数细胞中的抗原特异性活性, 并抑制炎症细胞 (如嗜酸性粒细胞等) 在炎症区域中的迁移, 从而减少过敏原、IgE受体等的表达, 从而有效地阻断单核细胞或树脂细胞中的过敏原反应。因此, 根据本发明一实施方式的菌株可以通过诱导抗炎性细胞因子IL-10的产生而表现出预防、改善或治疗炎症疾病、过敏或自身免疫性疾病等的活性。
- [0050] 根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可以加强肠上皮细胞之间的紧密连接。例如, 当葡聚糖硫酸钠 (DSS) 和菌株一起给药时, 与单独给药DSS的对照组相比, 紧密连接相关基因 (作为一实例, Zo-1或闭合蛋白 (Occludin)) 的表达可以超过1倍、1.1倍或更多、1.2倍或更多、1.3倍或更多、1.4倍或更多, 或1.5倍或更多, 或与使用DSS和普氏栖粪杆菌DSM17677菌株一起给药的对照组相比, 紧密连接相关基因 (作为一实例, Zo-1或闭合蛋白) 的表达可以超过1倍、1.01倍或更多、1.05倍或更多、1.1倍或更多、1.15倍或更多、1.2倍或更多、1.25倍或更多, 或1.3倍或更多。
- [0051] 当肠上皮细胞的紧密连接减弱时, 可能会发生一种免疫疾病, 肠通透性, 即漏肠。具体而言, 它是指一种现象, 即当紧密连接相关蛋白的表达和生产存在问题时, 肠上皮细胞必须建立保护屏障, 以诱导细胞“紧密连接”, 防止其他物质进入, 但引入外来物质, 肠道相

关淋巴组织 (GALT) 触发免疫应答, 导致炎症。根据本发明一实施方式的菌株可以通过加强肠上皮细胞的紧密连接来预防、改善或治疗肠道通透性或漏肠, 并且可以预防、改善、减轻或治疗炎性反应。

[0052] 根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可以改善肠道微生物平衡。当肠道微生物发生失衡时, 宿主和微生物群之间发生异常相互作用, 结果, 免疫内稳态被破坏, 免疫介导的疾病如自身免疫、过敏和慢性炎性疾病可能发生。根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可以通过改善体内肠道菌群的失衡来预防、改善、减轻或治疗炎性反应、过敏性疾病、自身免疫性疾病等。例如, 普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可具有选自以下(1)至(5)组成的组中的一种或多种特征:

[0053] (1) 诱导动物肠道菌群多样性的增加,

[0054] (2) 改善动物的生态失调,

[0055] (3) 诱导动物肠道中普雷沃氏菌属 (*Prevotella*) 和/或普雷沃氏菌科 (*Paraprevotellaceae*) 菌株的相对丰度增加或防止其相对丰度降低,

[0056] (4) 防止动物肠道菌群中有害细菌 (例如具有脂多糖细胞壁的菌株, 例如变形菌门菌株) 的相对丰度增加,

[0057] (5) 防止动物肠道菌群中拟杆菌属 (*Bacteroides*) 菌株的相对丰度增加。

[0058] 根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可对炎性疾病具有预防、改善或治疗活性。例如, 普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可具有选自以下(1)和(2)组成的组中的一种或多种特征:

[0059] (1) 防止因炎性疾病引起的体重减轻, 例如, 与单独给药DSS的对照组相比, 当葡聚糖硫酸钠 (DSS) 和菌株一起给药时, 体重减轻比率 (体重变化%) 小于1倍、0.9倍或更少、0.8倍或更少、0.7倍或更少、0.6倍或更少或0.5倍或更少,

[0060] (2) 防止因炎性疾病引起的肠道长度减少, 例如, 与单独使用DSS的对照组相比, 当葡聚糖硫酸钠 (DSS) 和菌株一起给药时, 肠道长度减少比率 (%) 小于1倍、0.9倍或更少、0.8倍或更少、0.7倍或更少、0.6倍或更少、0.5倍或更少、0.4倍或更小、0.3倍或更少、0.2倍或更少、或0.1倍或更少。

[0061] 本发明的其他实施方式涉及用于预防、改善或治疗炎性疾病的组合物, 其包含选自普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株, 其保藏编号为KCTC14231BP。

[0062] 炎性疾病是伴随炎症的疾病, 并且可以包括但不限于伴随炎症的任何疾病, 例如, 它可以是选自炎症性肠病、炎性皮肤病、炎性胶原血管病、特应性皮炎、过敏性疾病、自身免疫性疾病、自身免疫性炎性疾病、湿疹、哮喘、过敏性哮喘、支气管哮喘、鼻炎、过敏性鼻炎、结膜炎、过敏性结膜炎、食物过敏、类风湿性关节炎、风湿热、狼疮、系统性硬皮病、银屑病、银屑病关节炎、哮喘、古兰-巴雷综合征 (Guilian-Barre syndrome)、重症肌无力、皮炎、多发性肌炎、多发性硬化、自身免疫性脑脊髓炎、结节性多动脉炎、桥本甲状腺炎、颞动脉炎, 小儿糖尿病、斑秃、天疱疮、口疮性口炎、自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病 (Wegener granulomatosis)、干燥综合征 (Sjogren syndrome)、艾迪生病 (Addison's disease)、白塞氏病 (Behcet's disease)、水肿、结膜炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、慢性鼻窦

炎、喉咙痛、扁桃体炎、支气管炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、结肠炎、痛风、湿疹、痤疮、接触性皮炎、脂溢性皮炎、强直性脊髓炎、纤维肌痛、骨关节炎、肩周炎、肌腱炎、腱鞘炎、肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、败血症、血管炎和滑囊炎组成的组中的一种或多种。

[0063] 特应性皮炎是指表现出瘙痒的慢性或复发性炎性皮肤病症。

[0064] 过敏性疾病是指与免疫系统产生的免疫球蛋白E (IgE) 结合的嗜碱性粒细胞暴露于抗原和肥大细胞分泌的组胺, 导致周围组织炎症。

[0065] 自身免疫性疾病意味着对体内物质的免疫应答已经发生, 并且器官或组织中已经发生了由自身免疫引起的炎性反应。自身免疫性疾病可以是例如炎性皮肤病。炎性皮肤病可以是例如选自由特应性、银屑病、湿疹、痤疮、接触性皮炎和脂溢性皮炎组成的组中的一种或多种。自身免疫性疾病可以是局部自身免疫性疾病或全身自身免疫性疾病。局部自身免疫性疾病可以是例如选自由1型糖尿病、甲状腺功能减退症、甲状腺机能亢进症、特发性血小板减少症和粘膜白斑病组成的组中的一种或多种, 但不限于此。系统性自身免疫性疾病可以是选自由系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、干燥综合征、白塞氏病、系统性硬化、多发性肌炎和皮肌炎组成的组中的一种或多种, 但不限于此。

[0066] 炎性肠病 (IBD) 是胃肠道的炎性疾病, 其原因通常是未知的, 治疗炎性肠病的药物开发研究已经进行了大量的研究, 作为使用下一代测序方法分析炎性肠病和溃疡性结肠炎患者肠道菌群的结果, 与健康的正常人相比, 由于肠道菌群的多样性失调, 变形菌门 (Proteobacteria) 在患者中占主导地位。

[0067] 炎性肠病可以是选自由炎性结肠直肠病、溃疡性结肠炎 (UC)、肠炎、肠易激综合征 (IBS) 和克罗恩病 (CD) 组成的组中的一种或多种。

[0068] 根据本发明一实施方式的炎性疾病可引起选自由以下(1)至(10)组成的组中的一种或多种症状或病理现象:

[0069] (1) 诱导炎性细胞因子,

[0070] (2) 抑制抗炎性细胞因子,

[0071] (3) 自身免疫性过度激活,

[0072] (4) 动物体重减轻,

[0073] (5) 动物的肠道长度减少,

[0074] (6) 削弱动物肠上皮细胞的紧密连接,

[0075] (7) 动物的生态失调,

[0076] (8) 动物肠道菌群中有害细菌的相对丰度增加, 例如具有脂多糖细胞壁的菌株, 作为一实例, 变形菌门菌株,

[0077] (9) 动物肠道菌群中拟杆菌属菌株的相对丰度增加,

[0078] (10) 动物肠道菌群中普雷沃氏菌属和/或普雷沃氏菌科菌株的相对丰度降低。

[0079] 根据本发明一实施方式的组合物可以具有抗炎特性, 特别地, 它可以通过诱导抗炎性细胞因子产生而具有抗炎特性。例如, 当LPS和组合物一起给药时, 与单独给药LPS的对照组相比, 抗炎性细胞因子产量 (pg/mL) 可以超过1倍、1.5倍或更多、2倍或更多、2.5倍或更多、3倍或更多、3.5倍或更多、4倍或更多、超过4倍、4.1倍或更多、4.2倍或更多、4.3倍或更多、4.4倍或更多、或4.5倍或更多。抗炎性细胞因子可以是IL-10。

[0080] 根据本发明一实施方式的组合物可以具有增强动物肠上皮细胞之间紧密连接的

特征。例如,当葡聚糖硫酸钠(DSS)和组合物一起给药时,与单独给药DSS的对照组相比,紧密连接相关基因(作为一实例,Zo-1或闭合蛋白)的表达可以超过1倍、1.1倍或更多、1.2倍或更多、1.3倍或更多、1.4倍或更多、或1.5倍或更多,或者与DSS和普氏栖粪杆菌DSM17677一起给药的对照组相比,紧密连接相关基因(作为一实例,Zo-1或闭合蛋白)的表达可以超过1倍、1.01倍或更多、1.05倍或更多、1.1倍或更多、1.15倍或更多、1.2倍或更多、1.25倍或更多,或1.3倍或更多。

[0081] 根据本发明一实施方式的组合物可以改善肠道微生物平衡。例如,所述组合物可以具有选自由以下(1)至(5)组成的组中的一种或多种特征:

[0082] (1) 诱导动物肠道菌群多样性的增加,

[0083] (2) 改善动物的生态失调,

[0084] (3) 防止动物肠道菌群中有害细菌(例如具有脂多糖细胞壁的菌株,作为一实例,变形菌门(Proteobacteria)菌株)的相对丰度增加,

[0085] (4) 防止动物肠道菌群中拟杆菌属菌株的相对丰度增加,

[0086] (5) 诱导动物肠道中普雷沃氏菌属和/或普雷沃氏菌科菌株的相对丰度增加或防止其相对丰度降低。

[0087] 根据本发明一实施方式的组合物可以具有炎症疾病的预防、改善或治疗活性。例如,所述组合物可以具有选自由以下(1)至(2)组成的组中的一种或多种特征:

[0088] (1) 防止动物因炎症疾病引起的体重减轻,例如,与单独给药DSS的对照组相比,当葡聚糖硫酸钠(DSS)和组合物一起给药时,体重减轻比率(体重变化%)小于1倍、0.9倍或更少、0.8倍或更少、0.7倍或更少、0.6倍或更少或0.5倍或更少,

[0089] (2) 防止动物因炎症疾病引起的肠道长度减少,例如,与单独给药DSS的对照组相比,当葡聚糖硫酸钠(DSS)和组合物一起给药时,肠道长度减少比率(%)小于1倍、0.9倍或更少、0.8倍或更少、0.7倍或更少、0.6倍或更少、0.5倍或更少、0.4倍或更少、0.3倍或更少、0.2倍或更少、或者0.1倍或更少。

[0090] 该组合物可改善肠道微生物平衡。例如,该组合物可以增加动物肠道菌群的多样性。作为一实例,该组合物可以增加动物肠道中普雷沃氏菌属和/或普雷沃氏菌科菌株的相对丰度。作为一实例,该组合物可降低动物肠道中拟杆菌属和/或变形菌门菌株的相对丰度。

[0091] 该组合物可包含普氏栖粪杆菌菌株的胞外多糖。根据本申请的实例,已证实,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株特异性产生胞外多糖,因此该组合物可包含保藏编号为KCTC14231BP的普氏栖粪杆菌KBL10272菌株的胞外多糖。

[0092] 基于实验证实,与属于同一物种的其他菌株相比,根据本发明的普氏栖粪杆菌KBL10272菌株具有改善结肠炎疾病症状的优异功效,并已证实增强与肠上皮细胞之间的紧密连接功能有关的抗炎性细胞因子IL-10、Zo-1和闭合蛋白基因的表达以及肠道菌群恢复的效果。此外,通过实验和基因组学证实了由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株特异性产生的胞外多糖物质,并在BMDM的基础上证实了由普氏栖粪杆菌菌株培养液的抗炎性细胞因子IL-10的生产力。这样的结果意味着,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株可有效地用于预防、改善和治疗炎症性疾病。

[0093] 本发明的另一实施方式涉及具有抗炎活性的普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、

菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖。普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株，其保藏编号为KCTC14231BP。

[0094] 本发明的另一实施方式涉及产生具有抗炎活性的物质(例如,胞外多糖)的普氏栖粪杆菌、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或由菌株产生的胞外多糖。普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1026菌株,其保藏编号为KCTC14230BP,或普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP,并且优选地,可以是普氏栖粪杆菌KBL1427,其保藏编号为KCTC14331BP。

[0095] 本发明的另一实施方式涉及食品组合物,其包含选自由普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。普氏栖粪杆菌菌株如上所述。作为一实例,普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0096] 本发明的另一实施方式涉及益生元组合物,其包含选自由普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。普氏栖粪杆菌菌株如上所述。作为一实例,普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0097] 本发明的另一实施方式涉及一种用于改善肠道微生物平衡的组合物,其包含选自由普氏栖粪杆菌菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。普氏栖粪杆菌菌株如上所述。作为一实例,普氏栖粪杆菌菌株可以是普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,其保藏编号为KCTC14231BP。

[0098] 本发明的另一实施方式涉及一种预防、改善或治疗炎性疾病的方法,包括给予选自由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株(保藏编号为KCTC14231BP)、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。普氏栖粪杆菌KBL1027菌株、炎性疾病等如上所述。

[0099] 本发明的另一实施方式涉及一种改善肠道微生物平衡的方法,包括给予选自由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株(保藏编号为KCTC14231BP)、菌株的培养物、菌株的裂解物、菌株的提取物、培养物的提取物、裂解物的提取物或菌株产生的胞外多糖组成的组中的一种或多种。在本申请的实例中,作为给予根据本发明一实施方式的菌株的结果,诱导了肠道菌群多样性的增加,并且改善了动物的生态失调,特别是有害细菌(例如具有脂多糖细胞壁的菌株)的相对丰度的增加,作为一实例,在动物的肠道菌群中防止了变形菌门菌株,并且防止了动物的肠道菌群中拟杆菌属菌株的相对丰度增加,并且诱导了普雷沃氏菌属和/或普雷沃氏菌科菌株的相对丰富度增加,或者防止了动物的肠道菌群中相对丰度的降低。因此,通过给予根据本发明一实施方式的菌株,可以改善动物的肠道微生物平衡。

[0100] 在本文中,术语“活性成分”是指单独表现出所需活性的成分,或可与本身不具有活性的载体一起表现出活性的成分。

[0101] 在本文中,术语“预防”是指抑制或延缓疾病、紊乱或疾病的发生。当疾病、紊乱或疾病的发生被抑制或延迟一段预定时间时,可以认为预防是完全的。

[0102] 在本文中,术语“治疗”是指减轻、改善、缓解、抑制或延缓由疾病部分或完全引起的特定疾病、紊乱和/或疾病或症状,并降低严重程度,或减少一种或多种症状或特征的发

生。

[0103] 除了上述活性成分之外,本发明的组合物(例如药物组合物)还可包含一种或多种示出了相同或类似功能的活性成分。

[0104] 此外,根据本发明所属领域的技术人员可清楚地进行的方法,可通过使用药学上可接受的载体配制以单位剂量形式制备组合物,或通过包含在高剂量容器中制备组合物(例如根据本发明的药物组合物)。这里,术语“载体”是指允许将化合物容易地添加到细胞或组织中的化合物,术语“药学上可接受”是指生理上可接受的组合物,当给药到人体中时,通常不会引起过敏反应,如胃肠道紊乱和头晕或类似的反应。

[0105] 药学上可接受的载体是常用的,并且包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羧基苯甲酸甲酯、羧基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油等,但不限于此。

[0106] 此外,除了上述成分之外,根据本发明的组合物,例如药物组合物还可以包括添加剂,例如填料、抗凝剂、润滑剂、润湿剂、调味剂、乳化剂、防腐剂等。在此,组合物中包含的添加剂的含量没有特别限制,并且可以在用于常规制剂的含量范围内适当调整。

[0107] 此外,根据本发明的组合物,例如药物组合物、食品组合物或益生元组合物可以配制成口服制剂。口服制剂的非限制性实例包括片剂、锭剂、糖锭、水悬浮液、油性悬浮液、制备的粉末、颗粒、乳剂、硬胶囊、软胶囊、糖浆或酞剂等。为了配制用于口服给药的根据本发明的药物组合物,可以使用粘合剂如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、支链淀粉、纤维素或明胶;赋形剂如磷酸二钙;崩解剂,如玉米淀粉或红薯淀粉;硬脂酸镁、硬脂酸钙、富马酸硬脂酸钠等,并且可以使用甜味剂、芳香剂、糖浆等。此外,在胶囊的情况下,除了上述物质之外,还可以另外使用液体载体,如脂肪油等。

[0108] 在本文中,术语“赋形剂”是指除治疗剂之外的任何物质,并且是指用作或添加到药物组合物中作为递送治疗剂的载体或介质的物质。因此,它可以改善处理和储存特性,或者允许和促进组合物的单位剂量形成。

[0109] 根据本发明的组合物,例如药物组合物、食品组合物或益生元组合物,可以通过以各种形式配制来使用,例如口服制剂,包括液体、悬浮液、粉末、颗粒、片剂、胶囊、丸剂、提取物、乳剂、糖浆、气雾剂、无菌注射溶液注射液等,并且可以通过各种途径给药,包括口服给药或静脉给药、腹腔内给药、皮下给药、直肠给药、局部给药等。在此,术语“口服给药”是指为使活性物质被摄入而制备的物质,即,给药至胃肠道以供吸收。

[0110] 根据本发明的组合物,例如药物组合物、食品组合物或益生元组合物的优选剂量可以根据患者的状况和体重、年龄、性别、健康状况、饮食结构特异性、制剂性能、疾病程度、组合物给药时间、给药方法、给药时间或间隔、排泄率和药物类型,并且可以由本领域技术人员适当地选择。

[0111] 在本文中,术语“药物组合物的有效剂量”是指足以治疗特定症状的活性成分的组合物量。这可以根据药物组合物的配制方法、给药方法、给药时间和/或给药途径等而变化,也可以根据各种因素而变化,包括通过给予药物组合物实现的反应的类型和程度、种类、年龄、体重、常见健康状况、疾病的症状或严重程度、性别、饮食、待给药受试者的排泄、同时或一起使用的其他组合物的药物组分,以及药学领域中公知的类似因素,本领域技术人员可以容易地确定和开出所需治疗的有效剂量。

[0112] 根据本发明的药物组合物的给药可以每天给药一次或可以分几次给药。该组合物可以作为单独的治疗剂给药或与其他治疗剂联合给药,并且可以与常规治疗剂顺序或同时给药。考虑到所有上述因素,其给药量可以以最小量给药获得最大效果,而不会产生副作用。

[0113] 例如,根据本发明的组合物可以以每千克体重0.001~10,000mg、0.001~5,000mg、0.001~1,000mg、0.001~500mg、0.001~300mg、0.001~100mg、0.001~50mg、0.001~30mg、0.001~10mg、0.001~5mg、0.001~1mg、0.001~0.5mg、0.001~0.1mg、0.001~0.05mg、0.001~0.01mg、0.01~10,000mg、0.01~5,000mg、0.01~1,000mg、0.01~500mg、0.01~300mg、0.01~100mg、0.01~50mg、0.01~30mg、0.01~10mg、0.01~5mg、0.01~1mg、0.01~0.5mg、0.01~0.1mg、0.01~0.05mg、0.1~10,000mg、0.1~5,000mg、0.1~1,000mg、0.1~500mg、0.1~300mg、0.1~200mg、0.1~100mg、0.1~50mg、0.1~30mg、0.1~10mg、0.1~5mg、0.1~1mg、0.1~0.5mg、1~10,000mg、1~5,000mg、1~1,000mg、1~500mg、1~300mg、1~200mg、1~100mg、1~50mg、1~10mg、1~5mg、10~10,000mg、10~5,000mg、10~1,000mg、10~500mg、10~300mg、10~200mg、10~100mg、10~50mg、10~40mg、10~30mg、10~20mg、100~10,000mg、100~5,000mg、100~1,000mg、100~500mg、100~300mg、或100~200mg的日剂量给药,但不限于此。作为一实例,基于成年患者的口服给药,根据本发明的组合物的日剂量可以是0.001~10g/1天、0.001~5g/1天、0.01~10g/1天或0.01~5g/1日。此外,如有必要,每日总剂量可分为连续或非连续给药。

[0114] 在本文中,术语“菌株的培养物”是指根据本发明一实施方式培养菌株后获得的产物,并且培养物可以是根据本发明一实施方式的菌株的总培养物、稀释溶液、浓缩物、干燥材料、冻干材料、裂解物和/或馏分等,浓缩物可以通过离心或蒸发培养物获得,干燥材料可以通过使用干燥器等干燥培养物而获得,冻干材料可以使用冷冻干燥器等通过冷冻干燥而获得,裂解物可以物理地或通过菌株或培养物进行超声处理而获得,以及馏分可以通过将培养物、裂解物等应用于如离心、色谱等的方法来获得。培养物可以是固相(固体,例如干燥材料)、液相(液体)或流化相,但不限于此。在一个实例中,培养物可以指包含通过将根据本发明一实施方式的菌株培养一定时间而获得的培养菌株、其代谢产物和/或额外营养物等的总培养基。在一实例中,培养物可以是其中去除或不根据本发明一实施方式的菌株的培养物。在一实例中,培养物可以是指在培养基中培养根据本发明一实施方式的菌株的培养物中除菌株(微生物细胞)之外的其余组分。在一实例中,培养物可以是在培养基中培养根据本发明一实施方式的菌株的培养液中去除菌株(微生物细胞)的培养液(或培养物)。菌株被去除的培养液(或培养物)可以是无细胞培养液(或者培养物)或者包含死细胞的培养液,并且例如,它可以是通过过滤或离心(离心上清液)去除菌株的滤液和/或包含死细胞的培养液(或者培养液的干燥材料)。具体地,培养物可以表现出抗炎活性或炎症疾病的预防、改善或治疗活性,其水平与根据本发明一实施方式的菌株所表现的活性相当。作为一实例,培养物可包含由根据本发明一实施方式的菌株产生的胞外多糖。

[0115] 在本文中,术语“菌株的裂解物”可以是指通过化学或物理力量裂解根据本发明一实施方式的菌株而获得的产物。具体地,裂解物可以表现出抗炎活性或炎症疾病的预防、改善或治疗活性,其水平与根据本发明一实施方式的菌株所表现的活性相当。作为一实例,裂解物可包含由根据本发明一实施方式的菌株产生的胞外多糖。

[0116] 在本文中,术语“提取物”可以是指通过提取根据本发明一实施方式的菌株、菌株的培养物、菌株的裂解物或其混合物而获得的产物,而不考虑提取方法、提取溶剂、提取的组分或提取物的形式,并且是一个广泛的概念,其包括在提取后通过其他方法加工或处理可获得的所有物质。例如,提取物可以是根据本发明一实施方式的菌株的提取物、菌株的培养物的提取物或菌株的裂解物的提取物。具体地,提取物可以表现出抗炎活性或炎症疾病的预防、改善或治疗活性,其水平与根据本发明一实施方式的菌株、菌株的培养物或菌株的裂解物所表现的活性相当。作为一实例,提取物可包含由根据本发明一实施方式的菌株产生的胞外多糖。

[0117] 有益效果

[0118] 与传统菌株相比,根据本发明一实施方式的普氏栖粪杆菌菌株具有优异的抗炎性细胞因子生成促进作用,因此表现出抗炎特性,从而对炎症疾病表现出治疗作用,因此可以将其用于预防、改善和治疗炎症疾病的组合物中。

附图说明

[0119] 图1a是示出了基于16S rRNA的K0-16受试者和K0-13受试者的肠道菌群分析结果的图,其中,从K0-16受试者中分离出普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,从K0-13受试者中分离出KBL1026菌株。

[0120] 图1b是示出了K0-16受试者和K0-13受试者的肠道菌群分析结果的图,其中,从K0-16受试者中分离出普氏栖粪杆菌KBL1027菌株,从K0-13受试者中分离出KBL1026菌株。

[0121] 图2a是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的体重变化的图。

[0122] 图2b是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的结肠长度变化的图。

[0123] 图2c是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药测量结肠长度变化的过程的图。

[0124] 图3是示出了根据本发明一实施方式的在普氏栖粪杆菌菌株给药后的H&E染色结果的图。

[0125] 图4a是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的炎性细胞因子基因IL-10的表达变化的图。

[0126] 图4b是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的紧密连接基因Zo-1的表达变化的图。

[0127] 图4c是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的紧密连接基因闭合蛋白的表达变化的图。

[0128] 图5a是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药引起的肠道菌群多样性变化的图。

[0129] 图5b是示出了根据本发明一实施方式的在普氏栖粪杆菌菌株给药后通过肠道菌群的加权UniFrac距离的主成分分析结果的图。

[0130] 图5c是示出了根据本发明一实施方式的根据普氏栖粪杆菌菌株给药的用于研究肠道菌群变化的单变量分析(LefSE)结果的图。

- [0131] 图6是示出了用扫描电子显微镜观察普氏栖粪杆菌菌株的结果的图。
- [0132] 图7是示出了由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株特异性产生的胞外多糖的炎性功效的图。
- [0133] 图8是示出了根据其功能特征在普氏栖粪杆菌KBL1027菌株基因组中特异性存在的基因的图。
- [0134] 图9是示出了属于特异性存在于普氏栖粪杆菌KBL1027菌株基因组中的细胞壁和荚膜功能的基因的图。

具体实施方式

[0135] 在下文中,将通过以下实施例更详细地描述本发明。然而,这些实施例仅旨在说明本发明,但本发明的范围不受这些实施例的限制。

[0136] 实施例1新菌株的分离

[0137] 从韩国人的肠道菌群中分离出了新的普氏栖粪杆菌菌株。具体而言,从6个月内未服用抗生素的彼此不同的健康正常成年人提供的粪便样本中分离出用于分离肠道菌群的样本(首尔国立大学IRB批准号:1602/001-001)。粪便样本被运送到目前的实验室,并立即转移到厌氧室(Laboratory Products Inc.),用于分离菌株。样品在含有1.5%琼脂的YCFAG培养基中以直接涂片形式划线,然后在37°C的厌氧条件下培养最多48小时。培养后,随机选择完全分离的菌落并在YBHI培养基中培养。为了长期保存菌株,将甘油(25%v/v)添加到达到指数期的培养液中,并将其储存在-80°C超低温冰箱中。为了鉴定菌株,使用Wizard基因组纯化试剂盒(Promega)提取菌株的基因组DNA,然后使用16S rRNA基因作为靶标、使用下表1的27F/1492R引物(SEQ ID NO:1和2)进行PCR反应。

[0138] 表1

类别	序列(5' → 3')	SEQ ID NO:
正向	AGAGTTTGATYMTGGCTCAG	1
反向	TACGGYTACCTTGTTACGACT	2

[0140] 使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化,然后使用ABI3711自动测序仪(MacroGen)进行测序。16S rRNA分析结果如下表2所示,通过使用该序列信息与Chunlab的EzBioCloud程序(<http://www.ezbiocloud.net/identify>)进行多重比较,最终完成了菌株的鉴定。

[0141] 表2

[0142]

菌株名称	名称	序列	SEQ ID NO:
普氏栖粪杆菌	KBL1026	GACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAG TCGAACGAGTGAGAGAGAGCTTGCTTTCTCGAGC GAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACC TGCCTCAAAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGAC TGCTAATACCGCATAAGCCCACGACCCGGCATCGG GTAGAGGGAAAAGGAGCAATCCGCTTTGAGATGG CCTCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGT GCCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGACTGAG AGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCG CGTGGAGGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAACTCCT GTTGTTGAGGAAGATAATGACGGTACTCAACAAGG AAGTGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AAAACGTAGGTCACAAGCGTTGTCCGGAATTACTG GGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGAAGACAAGTT GGAAGTGAAATCCATGGGCTCAACCCATGAACTGC TTCAAACACTGTTTTTCTTGAGTAGTGCAGAGGTA GGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGA TATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTA CTGGGCACCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGT GGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCA CACTGTAAACGATGATTACTAGGTGTTGGAGGATT GACCCCTTCAGTGCCGACGTTAACACAATAAGTAA TCCACCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGG AGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACC TTACCAAGTCTTGACATCCTGCGACGCACATAGAA ACAGTAGTTTCCCTTCGGGACGCAGAGACAGGTGG TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGGT	3

		<p>CAGTTACTACGCAAGAGGACTCTGGCCAGACTGC CGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAATCATCATGCCCTTTATGACTTGGGCTACACACG TACTACAATGGCGTTAAACAAAGAGAAGCAAGAC CGCGAGGTGGAGCAAACTCAGAAACAACGTCCC AGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGA AGTCGGAATTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCT GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC CCGTCACACCATGAGAGCCGGGGGGACCCGAAGT CGGT</p>	
<p>普氏栖粪杆 菌</p>	<p>KBL1027</p>	<p>TGAATTTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGCGC CTAACACATGCAAGTCAACGAGCGAGAGAGAGC TTGCTTTCTCAGAGCGAGTGGCGAACGGGTGAGT AACGCGTGAGGAACCTGCCTCAAAGAGGGGGACA ACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAAGCCC ACGACCCGGCATCGGGTAGAGGGAAAAGGAGCAA TCCGCTTTGAGATGGCCTCGCGTCCGATTAGCTAG TTGGTGAGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCG GTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGG GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCCT GATGCAGCGACGCCGCGTGGAGGAAGAAGGTCTT CGGATTGTAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAATG ACGTACTCAACAAGGAAGTGACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGTCACAAGC GTTGTCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCA GGCGGGAAGACAAGTTGGAAGTCAAATCCATGGG CTCAACCCATGAACTGCTTTCAAAAGTGTTCCTT GAGTAGTGCAGAGGTAGGCGGAATCCCGGTGTA GCGGTGGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCCTACTGGGCACCAACTGACG CTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATT AGATAACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGATT ACTAGGGGTTGGAGGATTGACCCCTTCAGTGCCGC AGTTAACACAATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACG ACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCG ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACAT CCTGCGACGCACATAGAAATATGTGTTTCCTTCGG</p>	<p>4</p>

[0143]

[0144]		GACGCAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTATGGTCAGTTACTACGCAAGAG GACTCTGGCCAGACTGCCGTTGACAAAACGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCTTTA TGACTTGGGCTACACACGTACTACAATGGCGTTAA ACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAA ACTCAGAAACAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGGC TGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATTGCTAGTA ATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCC GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGA GCCGGGGGGACCCGAAGTCGGTAGTCTAACCGCA AGGAG	
--------	--	---	--

[0145] 分离到的两种新菌株分别命名为普氏栖粪杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) KBL1026菌株和普氏栖粪杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) KBL1027菌株,并于2020年7月7日保藏于位于韩国生命工学研究院 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Biological Resource Center) 的KCTC(韩国典型培养物保藏中心),并分别获得保藏编号KCTC14230BP(普氏栖粪杆菌KBL1026)和KCTC14231BP(普氏栖粪杆菌KBL1027)。

[0146] 实施例2新菌株的受试者肠道菌群结构分析

[0147] 实施例1中分离的新菌株-普氏栖粪杆菌KBL1026菌株源自K0-13受试者,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株源自于K0-16。为了分析新菌株的受试者肠道菌群结构,将安全的粪便样本储存在-80℃超低温冰箱中用于肠道菌群分析。将冷冻样本转移到实验室,并使用QIAamp FAST DNA粪便迷你试剂盒 (Qiagen) 提取粪便中的总细菌基因组DNA。使用针对细菌16S rRNA基因V4区的下表3的515F/806R引物 (SEQ ID NO:5和6) 扩增提取的DNA,然后使用MiSeq (Illumina) 生成序列数据。在生成的大容量测序分析中,通过使用QIIME管道确认肠道细菌的全部遗传信息来识别肠道菌群的结构。

[0148] 表3

类别	序列 (5'→3')	SEQ ID NO:
正向	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGC MGCCGCGGTAA	5
反向	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGTCAGTCAGCCGGACTACHVGG GTWTCTAAT	6

[0150] 作为基于16S rRNA分析肠道菌群的结果,如图1a所示,证实了分离出普氏栖粪杆菌KBL1027菌株的K0-16受试者比分离出KBL1026菌株的K0-13受试者具有较高的肠道菌群多样性(图1a)。

[0151] 此外,如图1b所示,作为在菌群的物种水平上占1%或更高比例的细菌分布的分析结果,确认K0-16受试者是高度优势的,因为肠道中的普氏栖粪杆菌菌株的相对丰度为15.5%或更高(图1b)。另一方面,证实了分离出KBL1026菌株的K0-13受试者占非常低的比例,因为肠道中的普氏栖粪杆菌菌株的相对丰度为0.8%(图1b)。

[0152] 受试者肠道中普氏栖粪杆菌相对丰度的差异表明,新获得的普氏栖粪杆菌 KBL1026和KBL1027菌株属于同一物种,但来源的受试者的肠道菌群环境不同,因此菌株的功能可能不同。

[0153] 实施例3用动物模型分析炎性疾病改善效果

[0154] (1) 动物模型构建和饮食

[0155] 为了确认在体内通过普氏栖粪杆菌KBL1026或KBL1027菌株的单一菌株给药的炎性疾病改善效果,进行了动物实验(首尔国立大学IACUC批准号:SNU-160602-9)。作为炎性疾病的实例,实验中使用炎性肠病动物模型。为了比较该菌株的炎性疾病改善效果,采用来自德国培养物保藏中心(DSMZ)的属于同一物种且已知具有抗炎作用的普氏栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)DSM17677菌株作为对照组。

[0156] 具体而言,为了构建结肠炎小鼠模型,将C57BL/6 7~8周龄的雌性小鼠分成各8只小鼠的群体,然后将2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)溶解在饮用水中,并使其总共饮用5天,以诱导急性肠炎。正常对照组提供不含DSS的饮用水。

[0157] 将普氏栖粪杆菌KBL1026、KBL1027或DSM17677菌株分别在37℃的厌氧条件下在YBHI液体培养基中培养,以达到指数期,然后去除上清液并在PBS中稀释至 2×10^8 CFU/ml,然后从DSS供应开始前一周开始直到实验结束,每天给小鼠口服200 μ l每种稀释菌株用于定植。正常对照组口服PBS各200 μ l。

[0158] (2) 体重变化分析

[0159] 在5天内(第5天上午)停止DSS供应,并且在从DSS供应开始之日(第0天)起的9天内,每天测量小鼠的体重变化,如图2a所示。图2a是示出了因急性肠炎引起的小鼠体重变化的图。如图2a所示,与未给予DSS(水+PBS)的正常对照组相比,DSS对照组(DSS+PBS)中体重显著降低,从而证实了结肠炎小鼠模型的构建。此外,与DSS对照组(DSS+PBS)相比,KBL1027给药组(DSS+KBL1027)的体重减轻效果显著改善。另一方面,在KBL1026给药组和DSM17677给药组中,与DSS对照组(DSS+PBS)相比,体重没有显著变化。

[0160] (3) 肠道长度分析

[0161] 在DSS供应开始后的第9天,终止实验并对小鼠进行尸检以测量肠道长度的变化,如图2b所示。如图2b所示,可以确认,与DSS对照组相比,KBL1027给药组的大肠长度的减少幅度显著改善。图2c是示出了在小鼠尸检后测量肠道长度的过程的图。

[0162] (4) 肠道组织病理学分析

[0163] 此外,进行苏木精-伊红(H&E)染色,以观察普氏栖粪杆菌单一菌株给药引起的大肠组织病理学变化。具体而言尸检后,将大肠远端固定在10%中性福尔马林溶液中,然后将石蜡组织标本切片至5 μ m厚,用H&E试剂染色,并用光学显微镜观察。H&E染色结果如图3所示,与正常对照组(水+PBS)相比,DSS对照组(DSS+PBS)中观察到大肠组织中炎性细胞的浸润和粘膜组织的显著破坏。另一方面,可以从组织学上证实,与DSS对照组(DSS+PBS)相比,KBL1027给药组(DSS+KBL1027)的炎性减轻。

[0164] (5) 利用标记基因分析体内改善炎性疾病的效果

[0165] 为了分析组织的免疫细胞,在实施例2的实验结束时,获得小鼠的肠组织并保存在RNAlater(Thermo Fisher Scientific)溶液中,并在-81℃下保持冷冻,为了提取RNA,使用易旋(easy-spin)总RNA提取试剂盒(Intron)。合成提取的RNA,立即使用大容量RNA到cDNA

试剂盒 (Applied biosystems) 等量合成cDNA, 然后使用roter基因SYBR绿色PCR试剂盒 (Qiagen) 分析基因表达。使用已知为抗炎性细胞因子的IL-10和Zo-1, 以及与肠上皮细胞之间紧密连接相关的闭合蛋白基因作为靶标, 使用表4的引物, 并用HPRT管家基因校正表达, 分析基因表达的结果如图4a (IL-10)、图4b (Zo-1) 和图4c (闭合蛋白) 所示

[0166] 表4

类别	靶标基因	序列 (5' → 3')	SEQ ID NO:
正向	HPRT	TTATGGACAGGACTGAAAGAC	7
反向	HPRT	GCTTTAATGTAATCCAGCAGGT	8
正向	IL-10	ATAACTGCACCCACTTCCCA	9
反向	IL-10	TCATTTCCGATAAGGCTTGG	10
正向	Zo-1	ACCCGAACTGATGCTGTGGATAG	11
反向	Zo-1	AAATGGCCGGCAGAAGTGTGTA	12
正向	Occludin	GGAGGACTGGGTCAGGGAATA	13
反向	Occludin	CGTCGTCTAGTTCTGCCTGT	14

[0168] 如图4a所示, 与DSS对照组 (DSS+PBS) 相比, KBL1027给药组 (DSS+KBL1027) 中抗炎性细胞因子IL-10基因的表达显著增加。这意味着, 普氏栖粪杆菌KBL1027菌株通过诱导IL-10产生的免疫调节有助于改善体内炎性疾病的效果。

[0169] 根据图4b和图4c的结果, 在与肠上皮细胞之间的紧密连接相关的Zo-1和闭合蛋白的情况下, 与正常对照组相比, 两个基因在DSS对照组 (DSS+PBS) 中的表达显著降低。另一方面, 与DSS对照组 (DSS+PBS) 相比, KBL1027给药组 (DSS+KBL1027) 中Zo-1和闭合蛋白的表达显著增加。这意味着KBL1027菌株的给药增加了Zo-1和闭合蛋白的表达, 并加强了肠上皮细胞之间的紧密连接, 从而有助于体内炎性疾病的减轻。

[0170] 实施例4用动物模型分析肠道菌群变化

[0171] 为了分析由DSS引起的急性肠炎和单个菌株定植诱导的肠道菌群的变化, 在实施例3的实验结束时, 获得小鼠粪便并将其冷冻在-81℃。根据实施例1的方法, 从冷冻样品中提取总细菌基因组DNA, 并使用细菌的16S rRNA基因的V4区作为靶标产生高容量序列数据。使用QIIME管道, 确认肠道细菌的总遗传信息, 并鉴定小鼠粪便中的菌群结构, 并根据组进行单变量分析 (LefSE), 结果如图5a至图5c所示。

[0172] 图5a中示出了用Faith的系统发育多样性指数确认根据基于16S rRNA的肠道菌群的组的肠道菌群多样性变化的结果, 并且确认了与正常对照组 (水+PBS) 相比, DSS对照组 (DSS+PBS) 中肠道菌群多样性显著降低。这表明, 根据DSS引起的急性肠炎, 有益细菌的多样性的减少和潜在有害细菌的优势可能会对肠道健康产生负面影响。另一方面, 证实, 与DSS对照组 (DSS+PBS) 相比, 普氏栖粪杆菌KBL1027给药组 (DSS+KBL1027) 肠道菌群的多样性显著增加, 而DSM17677给药组中 (DSS+DSM17677) 无显著性。这表明, 即使相同的普氏栖粪杆菌菌株, 对肠道菌群的影响也可能不同, 普氏栖粪杆菌KBL1027菌株给药可能会恢复肠道菌群的多样性, 从而对肠道健康产生积极影响。

[0173] 通过基于16S rRNA分析的肠道菌群的加权UniFrac距离进行主要成分分析的结果示于图5b中, 并且通过PCA图确认DSS对照组具有与正常对照组非常不同的肠道菌群结构。另一方面, 确认KBL1027给药组具有DSS对照组和正常对照组之间的肠道菌群结构。这表明,

KBL1027菌株给药改变了构成肠道菌群的物种,从而调节了结构。

[0174] 进行单变量分析(LefSE)以分析KBL1027菌株给药改变了哪些肠道菌群的结果如图5c所示。在DSS对照组中,拟杆菌属和代表性有益细菌变形菌门(其细胞壁由脂多糖(LPS)组成)的优势。这意味着KBL1027菌株给药通过改变肠道菌群有助于缓解结肠炎。

[0175] 实施例5普氏栖粪杆菌KBL1027菌株衍生物质的抗炎测试

[0176] (1)KBL1027菌株特异性胞外多糖的观察

[0177] 为了确认普氏栖粪杆菌菌株之间的特异性(菌株特异性),使用扫描电子显微镜(SEM)观察细菌样品的三维表面形状。

[0178] 具体而言,通过在37℃厌氧条件下在YBHI培养基中培养普氏栖粪杆菌KBL1026、KBL1027和DSM17677菌株48小时获得的样品在使用卡洛夫斯基(karnovsky)溶液和2%四氧化铁的临界点下进行固定、乙醇脱水和干燥的预处理过程。然后,将它们固定在短棒上并涂上铂,然后使用扫描电子显微镜(Carl Zeiss)进行观察。观察照片示于图6中,并且证实与KBL1026和DSM17677菌株相比,KBL1027在细胞表面上菌株特异性产生了胞外多糖物质。另一方面,在KBL1026的情况下,观察到类似于先前报道的DSM17677的形式。因此,通过对细菌细胞表面的观察,确认了KBL1027菌株特异性产生的物质,并且这种菌株特异性表明,与属于普氏栖粪杆菌物种的其他菌株相比,KBL1027菌株可能具有缓解炎症性疾病的优异功效。

[0179] (2)KBL1027菌株胞外多糖的抗炎功效

[0180] 为了验证由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株产生的物质的免疫调节作用,分离小鼠的骨髓来源的巨噬细胞(BMDM),并用普氏栖粪杆菌KBL1026、KBL1027和DSM17677菌株的培养液处理,以确认产生IL-10(参与抗炎反应的细胞因子)的能力。

[0181] 具体地说,为了获得该菌株的培养液,在37℃的厌氧条件下,将普氏栖粪杆菌KBL1026、KBL1027和DSM17677菌株在500ml YBHI培养基中培养48小时,通过离心获得上清液,并进行0.45μm过滤。作为阴性对照组,使用未接种该菌株的YBHI培养基,在-81℃保持冷冻后通过冷冻干燥制备固定培养基和上清液,并在PBS中以相同的量稀释至100mg/ml。

[0182] 为了获得小鼠的BMDM细胞,分离C57BL/6小鼠的骨髓,并在BMDM的培养基中在37℃、5%CO₂的条件下,使用培养箱培养7天,所述BMDM的培养基为将10%胎牛血清(FBS)、15%L292细胞培养液和1%青霉素/链霉素抗生素添加到DMEM培养液中。L292细胞购自韩国细胞系库(Korean CellLine Bank)。

[0183] 在将 2×10^4 个细胞等分到96孔板的每个孔中并将其附着24小时后,将阴性对照组YBHI培养基和普氏栖粪杆菌KBL1026、KBL1027和DSM17677菌株的上清液以1mg/ml的浓度添加到培养液中并替换。此外,为了确认对LPS诱导的炎症反应的刺激反应,以100ng/ml的浓度加入LPS,然后以相同的量加入每种菌株的上清液。作为阳性对照组,LPS以10ng/ml、100ng/ml的浓度处理,并且为了与普氏栖粪杆菌产生的丁酸代谢产物进行比较,将丁酸钠(sigma-Aldrich)以1ng/ml、10ng/ml处理。然后,在24小时内,收集培养液并在-81℃下冷冻,随后,根据制造商的方法,使用小鼠IL-10ELISA试剂盒(Thermo Fisher Scientific)测量IL-10细胞因子的量。

[0184] 结果如图7所示,证实了在小鼠的BMDM细胞中,与阴性对照组YBHI培养基以及KBL1026和DSM17677菌株的培养液相比,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株的培养液最显著地诱导抗炎性细胞因子IL-10的产生。此外,即使在通过LPS刺激炎症反应的情况下,IL-10产生

也比阴性对照组、YBHI培养基和KBL1026菌株的培养液显著诱导。这样的实验结果意味着由普氏栖粪杆菌KBL1027菌株特异性产生的物质诱导抗炎性细胞因子IL-10的产生。

[0185] 实施例6普氏栖粪杆菌KBL1027菌株的比较基因组学分析

[0186] 为了确认普氏栖粪杆菌菌株之间的特异性(菌株特异性),进行了比较基因组学分析。为了确保细菌的基因组信息,根据实施例1的方法,将KBL1026和KBL1027菌株在37℃的厌氧条件下在YBHI培养基中培养,以提取菌株的基因组DNA。在KBL1026的情况下,使用MiSeq(Illumina)生成大容量序列数据,并根据A5MiSeq管道进行组装,结果如下表5所示。在KBL1027的情况下,使用RSII(PacBio)获得基因组(完整基因组)的总信息。DSM17677的基因组信息从NCBI获得,并用于比较基因组学分析(保藏编号:GCA_000162015.1)。为了比较基因组的平均核苷酸同一性(ANI),由JSpeciesWS(<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#analyse>)计算,并将获得菌株的基因组信息的汇总和比较示于表5中。KBL1027菌株和KBL1026菌株的ANI值为96.13%,另一方面,DSM17677菌株的ANI值为83.25%。这意味着KBL1027菌株与KBL1026菌株的基因组序列相似性高于先前已知的DSM17677菌株。

[0187] 表5

[0188]

类别	KBL1026	KBL1027	DSM17677
大小(bp)	3,105,066	3,124,218	3,090,349
GC含量(%)	56.2	56.1	56.4
Contig N50(bp)	330,297	-	63,061
拼接(Scaffold)的数量	36	1	20
编码序列的数量	3,193	3176	3,298
RNA的数量	71	83	79
KBL1027的ANI(%)	96.13	100	83.25

[0189] 基于普氏栖粪杆菌菌株的获得基因组信息,使用RAST(<https://rast.nmpdr.org/>)根据RASTtk管道进行注释,并进行比较基因组学分析。与DSM17677菌株相比,KBL1027菌株基因组中特异性存在的基因总数为61个,与KBL1026菌株相比,KBL1027菌株基因组中特异性存在的基因总数为15个。这被解释为由于KBL1027菌株具有比DSM17677菌株更低的ANI值,所以特异性存在更多的基因。与两个比较菌株KBL1026菌株和DSM17677菌株相比,仅在KBL1027菌株的基因组中特异性存在的基因数量根据其功能特性示出于图8中。

[0190] 其中,在涉及实施例5中定义的胞外多糖物质产生的细胞壁和荚膜的功能的情况下,确认与KBL1026菌株相比有7个基因特异性存在,与DSM17677菌株相比有10个基因特异性存在。

[0191] 接下来,确认了在KBL1026菌株和DSM17677菌株中均不存在且仅在KBL1027菌株基因组中特异性存在的13个基因(以下(1)至(13)),其中7个(以下(1)至(7))属于细胞壁和荚膜的功能:

[0192] (1) 胞外多糖生物合成糖基转移酶EpsF(EC 2.4.1.-)

[0193] (2) 酪氨酸蛋白激酶EpsD(EC 2.7.10.2)

[0194] (3) α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶(EC 2.4.1.-)rgpA

- [0195] (4) α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶(EC 2.4.1.-) rgpB
- [0196] (5) 荚膜多糖生物合成蛋白
- [0197] (6) 脂蛋白释放系统ATP结合蛋白Lo1D
- [0198] (7) 假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一核苷醇葡萄糖醛酸基转移酶TuaG
- [0199] (8) N-乙酰葡萄糖胺利用的预测转录调节因子,GntR家族NagQ
- [0200] (9) 膜结合的溶胞胞壁质转糖苷酶B(EC 3.2.1.-)
- [0201] (10) 肌苷尿苷偏好核苷水解酶(EC 3.2.2.1)
- [0202] (11) LysR家族转录调节因子YnfL
- [0203] (12) 阳离子流出系统蛋白CusA
- [0204] (13) 钴锌镉抗性蛋白CzcA
- [0205] 图9中示出了属于普氏栖粪杆菌KBL1027菌株基因组中特异性存在的细胞壁和荚膜功能的基因,并且确认了KBL1027菌株特异性基因执行胞外多糖生物合成和含鼠李糖的聚糖的功能,并形成了簇(cluster) (图9的B)。图9的B是示出了确认图9的A中的1、3、4和5号基因的簇在普氏栖粪杆菌KBL1027菌株的基因组序列上的结果的图。这种比较基因组学分析的结果意味着,普氏栖粪杆菌KBL1027菌株特异性地产生胞外多糖物质。
- [0206] 保藏编号
- [0207] 保藏单位名称:位于韩国生命工学研究院的KCTC
- [0208] 保藏编号:KCTC14230BP
- [0209] 保藏日期:2020年7月7日
- [0210] 保藏单位名称:位于韩国生命工学研究院的KCTC
- [0211] 保藏编号:KCTC14231BP
- [0212] 保藏日期:2020年7月7日
- [0213] (翻译文本)
- [0214] 国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约
- [0215] 国际表格
- [0216] 基于原始保藏接收证明
- [0217] 收件人:Ko生物技术有限公司
- [0218] Ko生物技术有限公司(KoBioLabs)
- [0219] 韩国首尔冠岳区冠岳路1

I. 微生物的鉴定	
由交存人给予的名称: 普氏栖粪杆菌 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) KBL1026	国际保藏单位给予的保藏编号: KCTC14230BP
II. 科学描述和/或建议的分类学命名	
根据上述 I 鉴定的微生物附带有: [] 科学描述 [] 建议的分类学命名 (适用时用 × 标记)	
[0220]	III. 接收和受理
本国际保藏单位受理根据上述 I 鉴定的微生物, 收到日期为 2020 年 7 月 7 日。	
IV. 请求变更的接收	
本国际保藏单位接收根据上述 I 鉴定的微生物, 并接收根据布达佩斯条约接收将原始保藏转换为保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称: 韩国典型培养物保藏中心 地址: 韩国生命工学研究院 (KRIBB)	代表人签字日期: 日期: 2021 年 12 月 14 日

- [0221] 上述翻译文本与原文没有相违之处
- [0222] (翻译文本)
- [0223] 国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约
- [0224] 国际表格
- [0225] 基于原始保藏的接收证明
- [0226] 收件人: Ko 生物技术有限公司
- [0227] Ko 生物技术有限公司 (KoBioLabs)
- [0228] 韩国首尔冠岳区冠岳路1

I. 微生物的鉴定	
由交存人给予的名称: 普氏栖粪杆菌 (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) KBL1027	国际保藏单位给予的保藏编号: KCTC14231BP
II. 科学描述和/或建议的分类学命名	
根据上述 I 鉴定的微生物附带有: [] 科学描述 [] 建议的分类学命名 (适用时用 × 标记)	
[0229]	III. 接收和受理
本国际保藏单位受理根据上述 I 鉴定的微生物, 收到日期为 2020 年 7 月 7 日。	
IV. 请求变更的接收	
本国际保藏单位接收根据上述 I 鉴定的微生物, 并接收根据布达佩斯条约接收将原始保藏转换为保藏的请求。	
V. 国际保藏单位	
名称: 韩国典型培养物保藏中心 地址: 韩国生命工学研究院 (KRIBB)	代表人签字日期: 日期: 2021 年 12 月 14 日

[0230] 上述翻译文本与原文没有相违之处

<110> Ko生物技术有限公司(KoBioLabs, Inc.)
<120> 普氏栖粪杆菌菌株及其用途
<130> OPP20214018KR
<150> KR 10-2020-0102564
<151> 2020-08-14
<160> 14
<170> KoPatentIn 3.0
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) 27F引物
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)
<223> y是t或c
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)
<223> m是 a或c
<400> 1
agagtttgat ymtggctcag 20
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) 1492R引物
<220>
<221> misc_feature
<222> (6)
<223> y是t或c
<400> 2
tacggytacc ttgttacgac t 21
<210> 3
<211> 1383
<212> DNA

<213> 普氏栖粪杆菌 (*Faecaliberium prausnitzii*)

<400> 3

gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac gagtgagaga gagcttgctt 60
 tctcgagcga gtggcgaacg ggtgagtaac gcgtgaggaa cctgcctcaa agagggggac 120
 aacagttgga aacgactgct aataccgcat aagcccacga cccggcatcg gtagagggga 180
 aaaggagcaa tccgctttga gatggcctcg cgtccgatta gctagttggt gaggtaactg 240
 gcccaccaag gcgacgatcg gtagccggac tgagaggttg aacggccaca ttgggactga 300
 gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggggaaacc 360
 ctgatgcagc gacgccgcgt ggaggaagaa ggtcttcgga ttgtaaactc ctgtttgtga 420
 ggaagataat gacggtactc aacaaggaag tgacggctaa ctacgtgcca gcagccgagg 480
 taaaacgtag gtcacaagcg ttgtccggaa ttactgggtg taaagggagc gcagggcgga 540
 agacaagttg gaagtgaaat ccatgggctc aacctatgaa ctgctttcaa aactgttttt 600
 cttgagtagt gcagaggtag gcggaattcc cggtgtagcg gtggaatgcg tagatatcgg 660
 gaggaacacc agtggcgaag gcggcctact gggcaccaac tgacgctgag gctcgaaagt 720
 gtgggtagca aacaggatta gataccctgg tagtccacac tgtaaacgat gattactagg 780
 tgttgaggga ttgaccctt cagtgccga gttaacacaa taagtaatcc acctggggag 840
 tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc agtggagtat 900
 gtggtttaat tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagtc ttgacatcct gcgacgcaca 960
 tagaaacagt agtttccttc gggacgcaga gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg 1020
 tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgaac cttatggtc agttactacg 1080
 caagaggact ctggccagac tgccgttgac aaaacggagg aaggtgggga tgacgtcaaa 1140
 tcatcatgcc ctttatgact tgggctacac acgtactaca atggcgtaa acaaagagaa 1200
 gcaagaccgc gaggtggagc aaaactcaga aacaacgtcc cagttcggac tgcaggctgc 1260
 aactcgccctg cacgaagtgc gaattgctag taatcgcaga tcagcatgct gcggtgaata 1320
 cgttcccggg cttgtacac accgccctc acacatgag agccgggggg acccgaagtc 1380
 ggt 1383

<210> 4

<211> 1414

<212> DNA

<213> 普氏栖粪杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)

<400> 4

tgaatttggc tcaggacgaa cgctggcggc gcgcctaaca catgcaagtc gaacgagcga 60
 gagagagctt gctttctcag agcgagtggc gaacgggtga gtaacgcgtg aggaacctgc 120
 ctcaaagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac cgcataagcc cacgaccggg 180
 catcgggtag agggaaaagg agcaatccgc tttgagatgg cctcgcgtcc gattagctag 240
 ttggtgaggt aacggccccac caaggcgacg atcggtagcc ggactgagag gttgaacggc 300
 cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca 360
 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtggagga agaaggtctt cggattgtaa 420
 actcctgttg ttgaggaaga taatgacggt actcaacaag gaagtgacgg ctaactacgt 480

gccagcagcc gcggtaaaac gtaggtcaca agcgttgtcc ggaattactg ggtgtaaagg 540
 gagcgcagggc ggggaagacaa gttggaagtg aaatccatgg gctcaacca tgaactgctt 600
 tcaaaactgt ttttcttgag tagtgcagag gtaggcggaa ttcccgggtg agcggtgga 660
 tgcgtagata tcgggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tactgggcac caactgacgc 720
 tgaggctcga aagtgtgggt agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc aactgtaaa 780
 cgatgattac taggggttgg aggattgacc cttcagtgc cgcagttaac acaataagta 840
 atccacctgg ggagtacgac cgcaaggtg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgac 900
 aagcagtgga gtatgtggtt taattcgacg caacgcgaag aacctacca agtcttgaca 960
 tcctgcgacg cacatagaaa tatgtgtttc ctccgggacg cagagacagg tgggtcatgg 1020
 ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg gttaaagtc gcaacgagcg caacccttat 1080
 ggtcagttac tacgcaagag gactctggcc agactgccgt tgacaaaacg gaggaaggtg 1140
 gggatgacgt caaatcatca tgccctttat gacttgggct acacacgtac tacaatggcg 1200
 ttaaacaaaag agaagcaaga ccgcgaggtg gagcaaaact cagaaacaac gtcccagttc 1260
 ggactgcagg ctgcaactcg cctgcacgaa gtcggaattg ctagtaatcg cagatcagca 1320
 tgctgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagccgg 1380
 ggggacccga agtcggtagt ctaaccgcaa ggag 1414

<210> 5

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> (合成的) 515F引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)

<223> m是a或c

<400> 5

atgatacggc gaccaccgag atctacacta tggttaattgt gtgccagcmg ccgcggtaa 59

<210> 6

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> (合成的) 806R引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (44)

<223> h是a、c或 t

<220>

<221> misc_feature
 <222> (45)
 <223> v是g、c或a
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (50)
 <223> w是a或t
 <400> 6
 caagcagaag acggcatacag agatagtcag tcagccggac tachvgggtw tctaata 56
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> (合成的) HPRT引物 FWD
 <400> 7
 ttatggacag gactgaaaga c 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> (合成的) HPRT引物 RVS
 <400> 8
 gctttaatgt aatccagcag gt 22
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> (合成的) IL-10引物 FWD
 <400> 9
 ataactgcac ccaacttccca 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> (合成的) IL-10引物 RVS

<400> 10
tcatttccga taaggcttgg 20
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) Zo-1引物 FWD
<400> 11
accgaaaact gatgctgtgg atag 24
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) Zo-1引物 RVS
<400> 12
aatggccgg gcagaacttg tgta 24
<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) 闭合蛋白引物FWD
<400> 13
ggaggactgg gtcagggaat a 21
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> (合成的) 闭合蛋白引物RVS
<400> 14
cgtcgtctag ttctgctgt 20

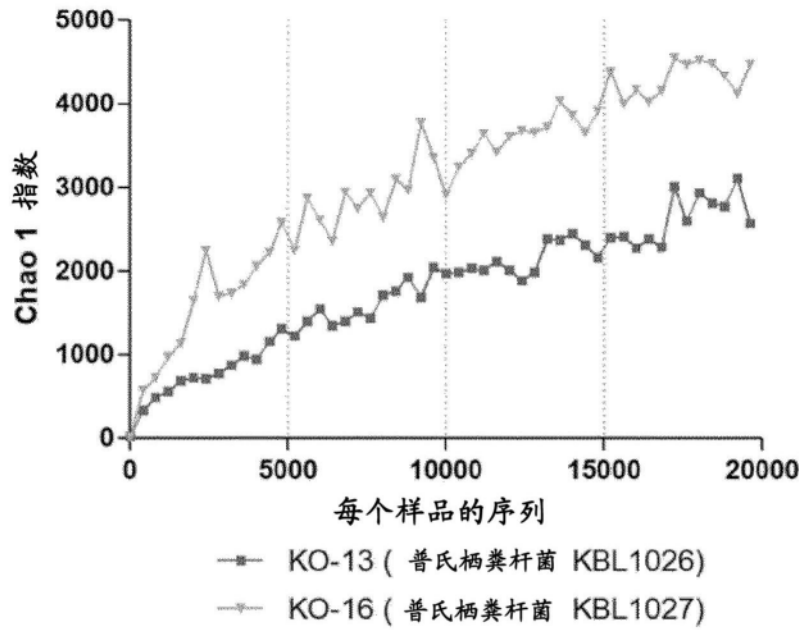


图1a

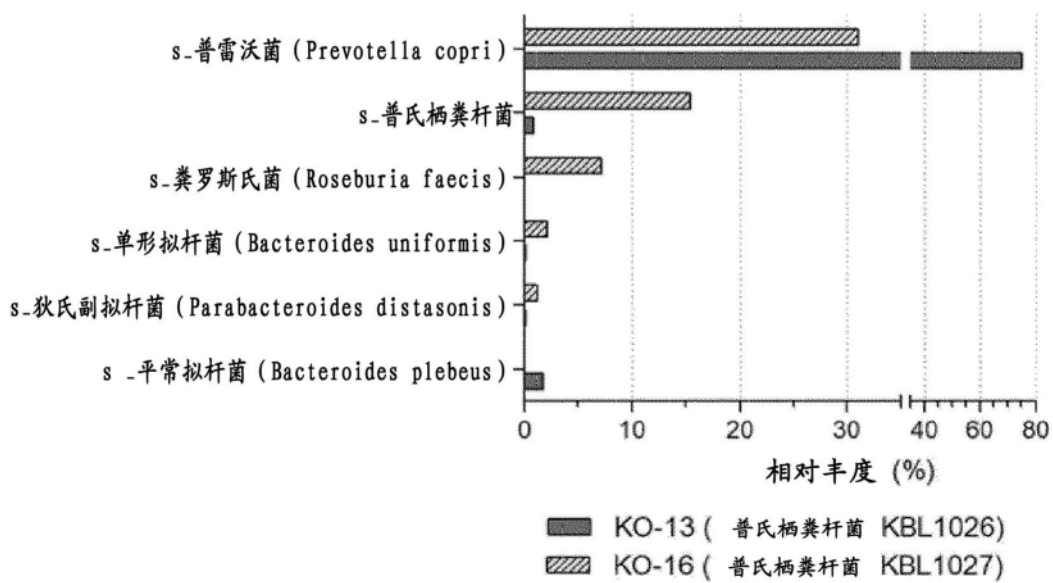


图1b

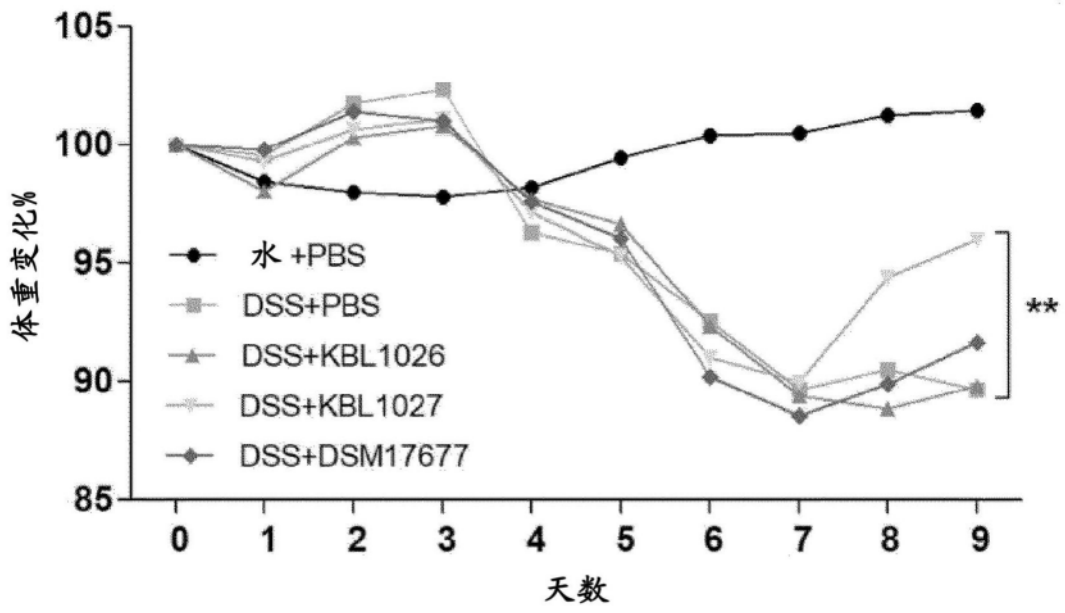


图2a

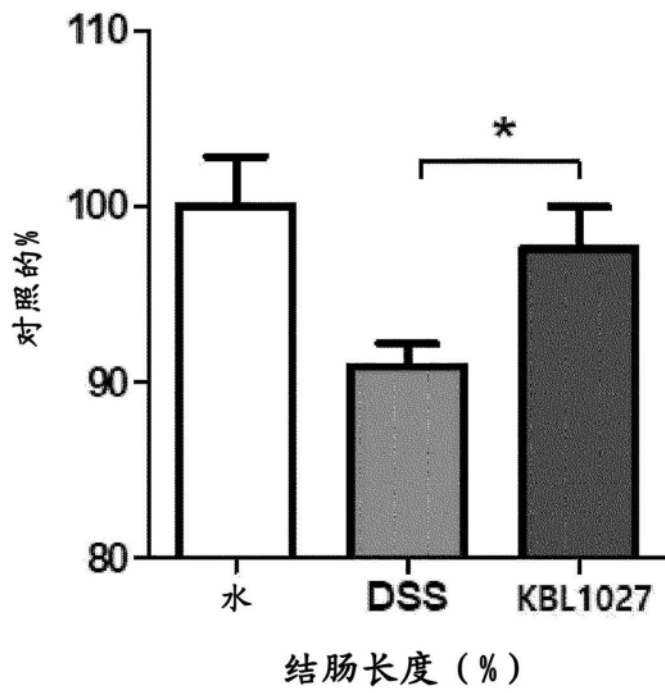


图2b

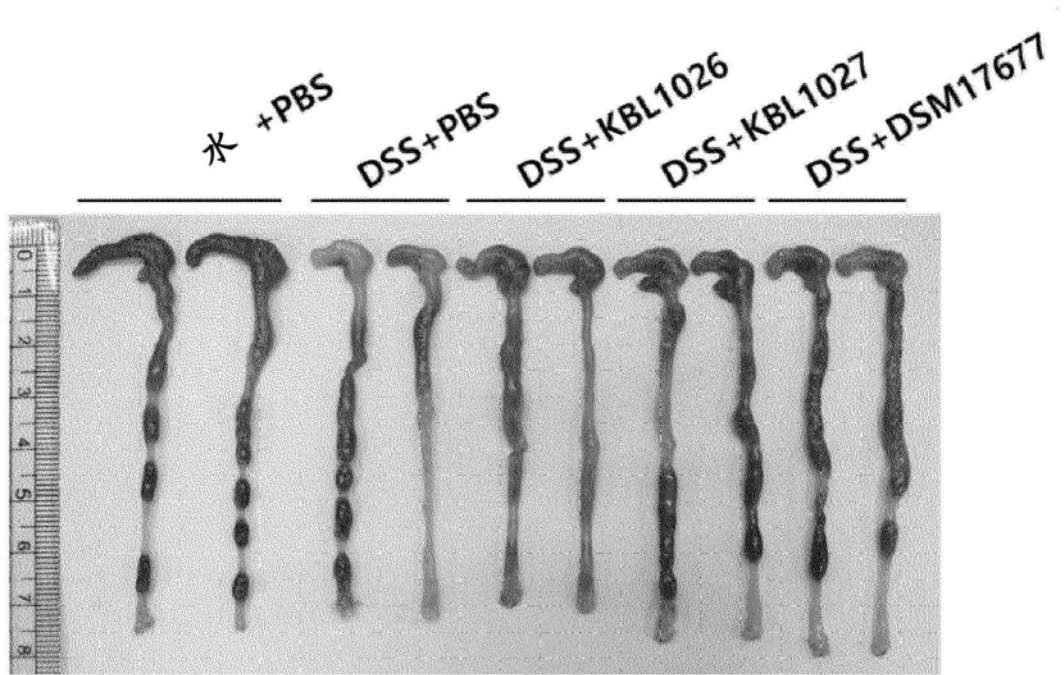


图2c

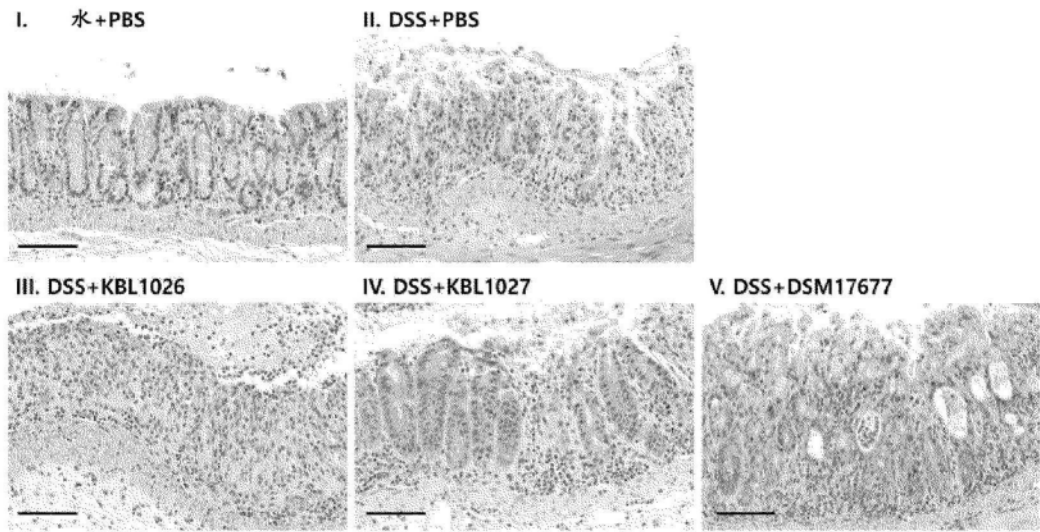


图3

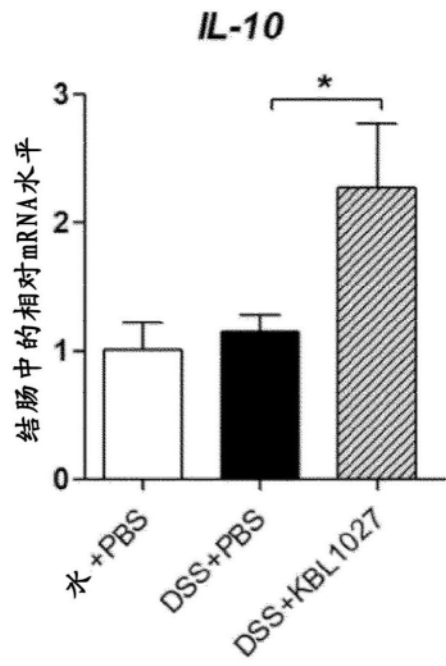


图4a

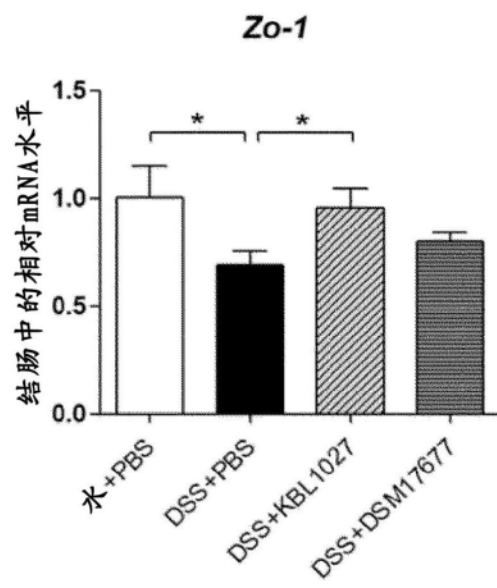


图4b

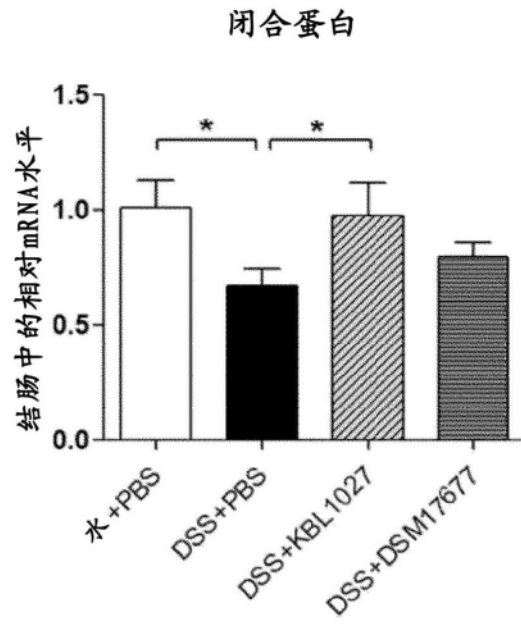


图4c

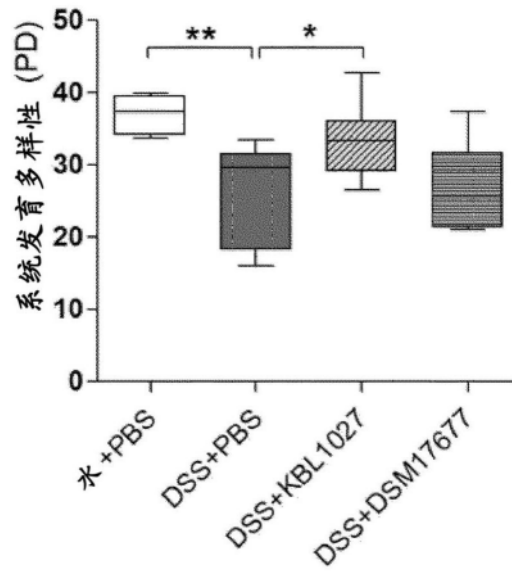


图5a

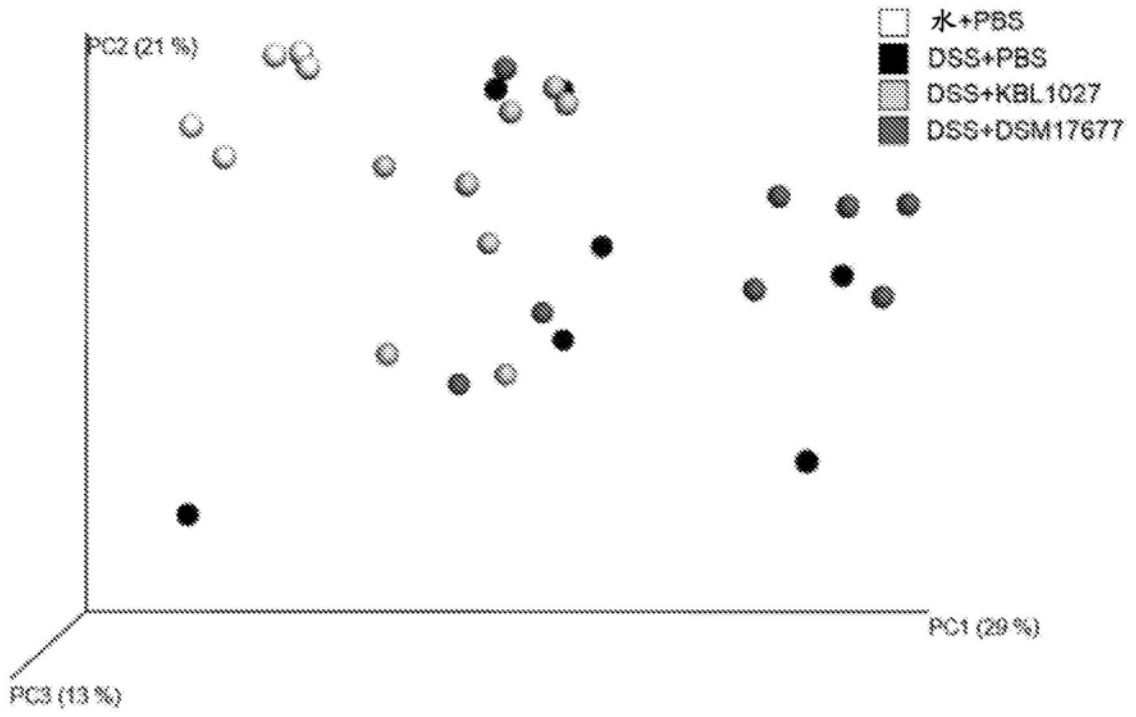


图5b

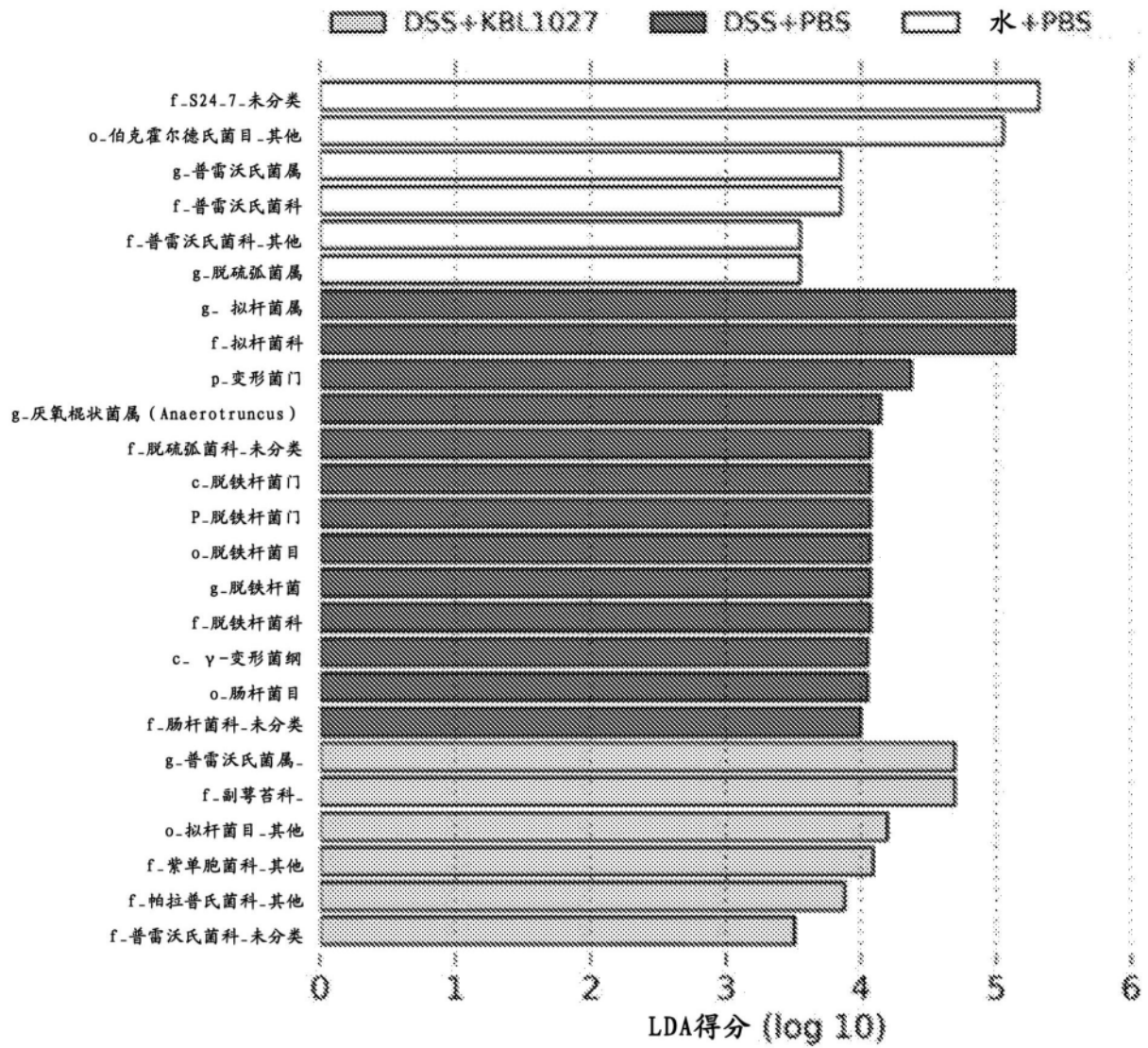


图5c

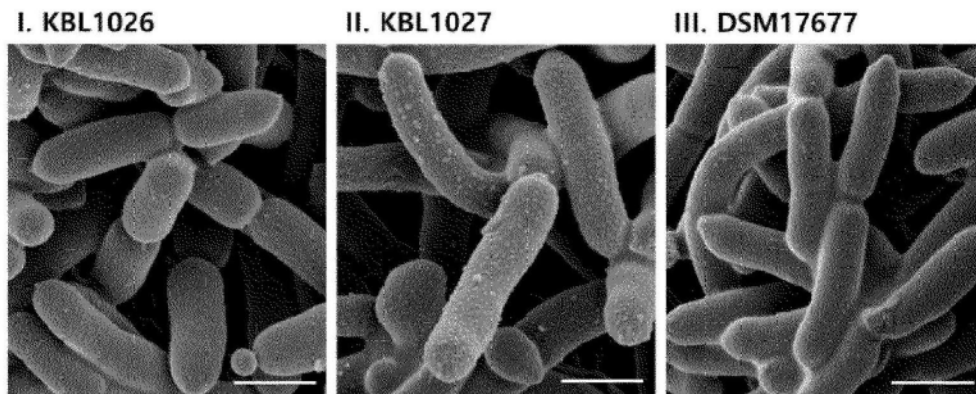


图6

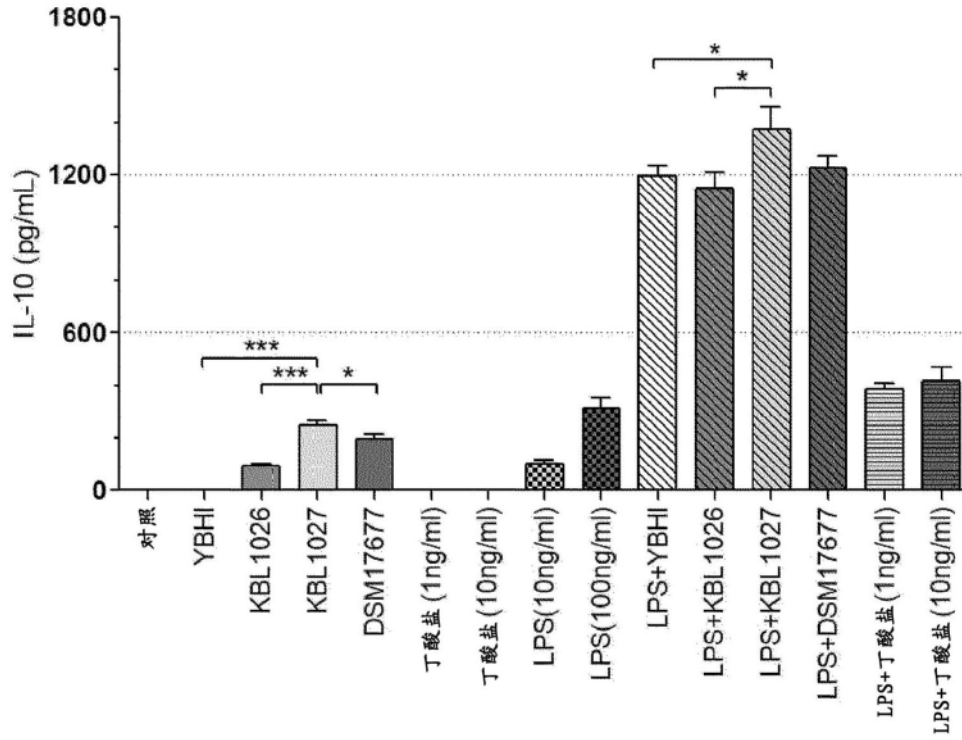


图7

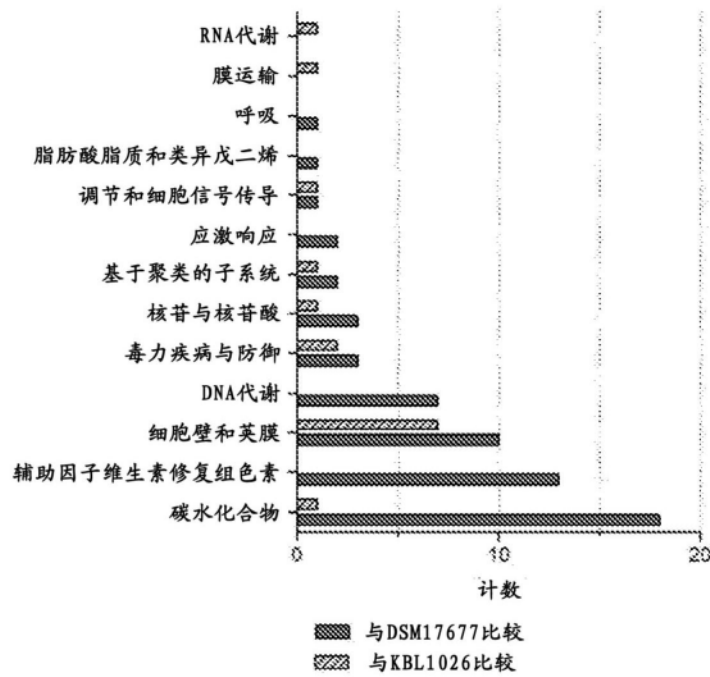


图8

A

表列	子类别	子系统	作用	序号
1	荚膜多糖和胞外多糖	胞外多糖生物合成	胞外多糖生物合成糖基转移酶EpsF (EC 2.4.1.-)	1.138
2	荚膜多糖和胞外多糖	胞外多糖生物合成	酪氨酸蛋白激酶EpsD (EC 2.7.10.2)	1.139
3	荚膜多糖和胞外多糖	含鼠李糖的聚糖	α -D-GlcNAc α -1,2-L-鼠李糖基转移酶 (EC 2.4.1.1.-)	1.140
4	荚膜多糖和胞外多糖	含鼠李糖的聚糖	α -L-Rha α -1,3-L-鼠李糖基转移酶 (EC 2.4.1.1.-)	1.141
5	荚膜多糖和胞外多糖	含鼠李糖的聚糖	荚膜多糖生物合成蛋白	1.142
6	草兰氏阴性细胞壁成分	脂蛋白分选系统	脂蛋白释放系统ATP结合蛋白Loid	1.143
7	草兰氏阳性细胞壁成分	糖醛酸磷酸生物合成	假定的N-乙酰半乳糖胺基-二磷酸十一萆醇葡萄糖醛酸基转移酶	1.144

B

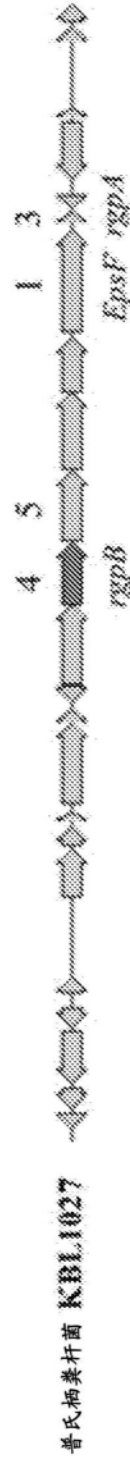


图9