

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 7 月 2 日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/133805 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) *A61K 35/747* (2015.01)
A23L 33/135 (2016.01) *C12R 1/225* (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/082656

(22) 国际申请日: 2019 年 4 月 15 日 (15.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

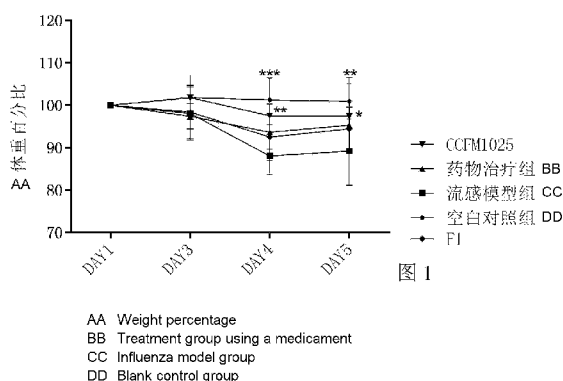
201811598890.5 2018 年 12 月 26 日 (26.12.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号
张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 陈卫(CHEN, Wei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 陆文伟(LU, Wenwei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 翟齐啸(ZHAI, Qixiao); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 刘馨阳(LIU, Xinyang); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 赵建新(ZHAO, Jianxin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 杭锋(HANG, Feng); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 张

(54) Title: PROBIOTIC MIXED FORMULATION HAVING ANTI-INFLUENZA CAPABILITY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂及其应用



(57) Abstract: The present invention belongs to the technical field of microorganisms and the technical field of medicine, and a probiotic mixed formulation having anti-influenza capabilities and use thereof are disclosed. This probiotic mixed formulation has anti-influenza effects, specifically embodied in: (1) significantly alleviating the degree of weight loss of influenza mice; (2) significantly improving blood index of influenza mice; (3) significantly alleviating inflammation of respiratory tract infection of influenza mice; (4) significantly reducing lung viral load of influenza mice (namely, significantly inhibiting the replication and proliferation of an influenza virus in influenza mice); and (5) significantly increasing the expression amount of pulmonary antiviral protein MxA of influenza mice. Therefore, the probiotic mixed formulation has great application prospects in the preparation of products for the prevention and/or treatment of atopic dermatitis and even the prevention and/or treatment of influenza.

(57) 摘要: 本发明公开了一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂及其应用, 属于微生物技术领域以及医药技术领域。此益生菌混合制剂具有抗流感的作用, 具体体现在: (1) 显著改善流感小鼠体重下降程度; (2) 显著改善流感小鼠血液指标; (3) 显著改善流感小鼠的呼吸道感染炎症状况; (4) 显著降低流感小鼠肺部病毒载量(即显著抑制流感病毒在流感小鼠体内的复制、增值); (5) 显著增强流感小鼠肺部抗病毒蛋白MxA的表达量, 因此, 此益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗特应性皮炎乃至预防和/或治疗流感的产品中, 具有巨大的应用前景。

灏(ZHANG, Hao): 中国江苏省无锡市蠡湖大道
1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和 48.2(a) (viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂及其应用

技术领域

本发明涉及一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂及其应用，属于微生物技术领域以及医药技术领域。

背景技术

流感常在秋冬季时大流行，主要由流感病毒诱发。流感病毒可分为甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒三种，人所患的流感主要是由甲型流感病毒和乙型流感病毒引起的。一般动物流感病毒不会感染人，人流感病毒也不会感染动物，但是猪比较例外。猪既可以感染禽流感病毒，也可以感染人流感病毒，但主要还是感染禽流感病毒，不过，它们一旦感染禽流感病毒，就极易传染给人，引起人流感大流行，例如，1819-1920年发生的“西班牙流感”。

“西班牙流感”作为世界历史上最严重的一次流感大流行，涉及范围广，临床发病率高，高达40%，并伴随多种类型的肺炎并发症，造成2000-4000万人的死亡，死亡人数远远超出第一次世界大战。因受科学技术条件的限制，当时人们未能分离出“西班牙流感”的致病原，直到1997年，美国科学家在《Science》上发表称1918年的流感病毒与猪流感病毒十分相似，是一种与甲型流感病毒（H1N1）密切相关的病毒。

而随后的近一百年时间内，世界范围内仍爆发了多次流感大流行，造成不同程度的人员受难及经济损失。可以说，从流感出现以来，就一直无法完全控制，呈现间断式爆发。

流感无法完全控制的一个主要原因就在于，虽然，多数流感病毒不耐热，于56℃下加热30分钟即可灭活，在室温下传染性亦很快会丧失，但是，流感病毒的变异度极高，其中，变异最频繁的应属甲型流感病毒，每隔十几年便会发生一个抗原大变异，产生一个新的毒株，这种变化称作抗原转变/抗原的质变；在流感病毒亚型内也会发生抗原的小变异，主要是抗原氨基酸序列的点突变，称作抗原漂移/抗原的量变，从而使得人们无法拥有长期有效预防流感的疫苗。

医药领域对流感病毒的致病机理研究早已开展。动物实验研究表明，有多种致病通路可诱发呼吸道的感染，继而引起严重的呼吸系统疾病，而呼吸系统疾病引发的炎症主要集中在动物肺部，表现为肺炎形式，例如，组织病理学检查呼吸道感染小鼠肺部可发现小鼠肺泡结构被破坏，肺间隔断裂，肺泡上皮细胞坏死、脱落等病变；少部分小鼠肺组织可见肺间隔增宽；小鼠局部病变肺组织可见上皮细胞增生。

目前，世界卫生组织认为每年在流感流行高峰前期接种疫苗是最有效的预防手段。现阶段，已经上市的三价流感疫苗有灭活流感疫苗（TIV）和减毒活疫苗（LAIV）两种，由3种病毒组成，包含2种甲型流感病毒株和1种乙型流感病毒株。而相关流感感染的药物治疗主要有两类西药，一类是神经氨酸酶抑制剂如奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦，其机理是通过作用在病毒表面的糖蛋白神经氨酸酶，使病毒颗粒无法侵害人体细胞；另一类是M2离子通道阻滞剂如金刚烷胺和金刚乙胺，此类药物是作用于质子通道M2蛋白，通过阻扰其蛋白离子通道以抑制甲型流感病毒的复制。

但是，疫苗注射不能长久有效保护机体不受病毒侵染，而药物治疗在杀死病毒的同时对中枢神经系统有副作用。因此，仍然需要一种药物或治疗方式，既能够长久有效保护机体不受流感病毒侵染，也能够缓解流感的一些临床病症，同时，不会给患者中枢神经系统带来副作用。

近年，大量的研究表明，肠道微生物对于维持人体健康有着重要的作用，同时，益生菌在人类干预研究中对健康的影响包括改善儿童急性腹泻，缓解儿童牛奶过敏、特应性皮炎以及缓解人肠易激综合征，并且，益生菌可能通过肠道粘膜产生影响，通过抑制病原微生物的生长来平衡局部微生物群，进而增强局部和全身免疫反应，此外，益生菌还可能影响肠道内容物中微生物群的组成和活性；也已有报道指出，病毒引起的流感可影响肠道菌群结构，且特定益生菌可有效减轻急性轮状病毒胃肠炎的持续时间和严重程度。因此，或许可从肠道微

生物入手, 尝试找到预防以及治疗流感的新药物或新方法, 以克服现有治疗药物以及治疗方法副作用明显等的缺陷。

发明内容

为解决上述问题, 本发明提供了一种含有粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 以及短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的益生菌混合制剂。此益生菌混合制剂具有抗流感的作用, 具体体现在: (1) 显著改善流感小鼠体重下降程度; (2) 显著改善流感小鼠血液指标; (3) 显著改善流感小鼠的呼吸道感染炎症状况; (4) 显著降低流感小鼠肺部病毒载量 (即显著抑制流感病毒在流感小鼠体内的复制、增值); (5) 显著增强流感小鼠肺部抗病毒蛋白 MxA 的表达量, 因此, 此益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗特异性皮炎乃至预防和/或治疗流感的产品中, 具有巨大的应用前景。

本发明的技术方案如下:

本发明提供了一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂, 所述益生菌混合制剂含有粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 以及短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026;

所述粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 已于 2018 年 10 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No.60460, 保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼;

所述短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 已于 2018 年 10 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为 GDMCC No.60459, 保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼。

所述粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 是从人体粪便中分离得到的, 该菌株经测序分析, 其 16S rRNA 序列如 SEQ ID NO.1 所示, 将该序列在 GenBank 中进行比对, 结果显示菌株为粘膜乳杆菌, 命名为粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025。

所述粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 的菌体呈短杆状; 菌落为圆形粗糙、透明; 于 45℃ 生长, 15℃ 不生长; 37℃ 下在 MRS 液体培养基中培养 12 小时即达到稳定期, 异型发酵, 从葡萄糖产酸产气。

所述短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 是从人体粪便样本中分离得到的, 该菌株经测序分析, 其 16S rRNA 序列如 SEQ ID NO.2 所示, 将该序列在 GenBank 中进行比对, 结果显示菌株与短双歧杆菌的覆盖率 (Query cover) 为 100%、相似度 (Ident) 为 99%, 故判定菌株为短双歧杆菌, 命名为短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026。

所述短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的菌体呈短棒状, 革兰氏染色阳性, 亚甲基蓝染色着色不规则, 无芽孢、鞭毛和荚膜, 不运动; 菌落为圆形白色; 于 37℃ 厌氧条件下培养 30 h 可达稳定期, 利用葡萄糖进行非典型异性乳酸发酵途径。

在本发明的一种实施方式中, 所述益生菌混合制剂中粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL; 所述益生菌混合制剂中短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

本发明提供了上述益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用。

在本发明的一种实施方式中, 所述产品中, 粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

在本发明的一种实施方式中, 所述产品包含食品、药品或保健食品。

在本发明的一种实施方式中, 所述药品含有益生菌混合制剂、药物载体和/或药用辅料。

在本发明的一种实施方式中, 所述食品包含使用含有益生菌混合制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品; 或所述食品包含含有益生菌混合制剂的固体饮料。

本发明提供了一种用于预防和/或治疗流感的产品, 所述产品含有上述一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂。

在本发明的一种实施方式中, 所述产品中, 粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025

的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

在本发明的一种实施方式中，所述产品包含食品、药品或保健食品。

在本发明的一种实施方式中，所述药品含有益生菌混合制剂、药物载体和/或药用辅料。

在本发明的一种实施方式中，所述食品包含使用含有益生菌混合制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品；或所述食品包含含有益生菌混合制剂的固体饮料。

在本发明的一种实施方式中，所述发酵剂的制备方法为将 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 按照占培养基总质量 5~8% 的接种量接种到培养基中，于 37°C 的厌氧环境下培养 30 h，得到培养液；将培养液离心，得到菌体；将菌体用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液清洗 2~4 次后用含 100 g/L 的海藻糖冻干保护剂重悬，得到重悬液；将重悬液真空冷冻法冻干，得到 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 菌粉；

将粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 按照占培养基总质量 5~8% 的接种量接种到培养基中，于 37°C 下培养 18 h，得到培养液；将培养液离心，得到菌体；将菌体用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液清洗 2~4 次后用含 100 g/L 的海藻糖冻干保护剂重悬，得到重悬液；将重悬液真空冷冻法冻干，得到粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 菌粉；

将得到的粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 菌粉与短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 菌粉混合，得到发酵剂；

所述冻干保护剂和菌体的质量比为 2:1。

在本发明的一种实施方式中，所述培养基的 pH 为 6.8。

在本发明的一种实施方式中，所述保护剂包含 100 g/L 的脱脂奶粉、150 g/L 的海藻糖以及 10 g/L 的 L-谷氨酸钠。

有益效果：

本发明提供了一种含有粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 以及短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的益生菌混合制剂，此益生菌混合制剂具有抗流感的作用，具体体现在：

- (1) 显著改善流感小鼠体重下降程度；
- (2) 显著改善流感小鼠血液指标；
- (3) 显著改善流感小鼠的呼吸道感染炎症状况；
- (4) 显著降低流感小鼠肺部病毒载量（即显著抑制流感病毒在流感小鼠体内的复制、增值）；
- (5) 显著增强流感小鼠肺部抗病毒蛋白 MxA 的表达量，

因此，此益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗特应性皮炎乃至预防和/或治疗流感的产品中，具有巨大的应用前景。

生物材料保藏

一株粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025，分类学命名为 *Lactobacillus mucosae*，已于 2018 年 10 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No.60460，保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼。

一株短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026，分类学命名为 *Bifidobacterium breve*，已于 2018 年 10 月 11 日保藏于广东省微生物菌种保藏中心，保藏编号为 GDMCC No.60459，保藏地址为广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼。

附图说明

图 1：不同组别流感小鼠的体重变化对比（粘膜乳杆菌）。

图 2：不同组别流感小鼠的血液检测指标（中性粒细胞）对比（粘膜乳杆菌）。

图 3：不同组别流感小鼠的血液检测指标（淋巴细胞）对比（粘膜乳杆菌）。

图 4：不同组别流感小鼠的肺部组织病理学切片对比（粘膜乳杆菌）。

图 5：不同组别流感小鼠的肺部病毒载量对比（粘膜乳杆菌）。

- 图 6: 不同组别流感小鼠的体重变化对比(短双歧杆菌)。
- 图 7: 不同组别流感小鼠的血液检测指标(中性粒细胞)对比(短双歧杆菌)。
- 图 8: 不同组别流感小鼠的血液检测指标(淋巴细胞)对比(短双歧杆菌)。
- 图 9: 不同组别流感小鼠的肺部组织病理学切片对比(短双歧杆菌)。
- 图 10: 不同组别流感小鼠的肺部抗病毒蛋白 MxA 的表达量对比(短双歧杆菌)。
- 图 11: 不同组别流感小鼠的体重变化对比(混菌)。
- 图 12: 不同组别流感小鼠的血液检测指标(中性粒细胞)对比(混菌)。
- 图 13: 不同组别流感小鼠的血液检测指标(淋巴细胞)对比(混菌)。
- 图 14: 不同组别流感小鼠的肺部组织病理学切片对比(混菌)。
- 图 15: 不同组别流感小鼠的肺部病毒载量对比(混菌)。
- 图 16: 不同组别流感小鼠的肺部抗病毒蛋白 MxA 的表达量对比(混菌)。

具体实施方式

下述实施例中涉及的培养基如下:

MRS 平板(g/L): 蛋白胨 10g/L、牛肉膏 10g/L、葡萄糖 20g/L、乙酸钠 2g/L、酵母粉 5g/L、柠檬酸氢二铵 2g/L、 $K_2PO_4 \cdot 3H_2O$ 2.6g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L、 $MnSO_4$ 0.05g/L、吐温 80 1ml/L、琼脂 20g/L、半胱氨酸盐酸盐 0.5g/L。

实施例 1-1: 粘膜乳杆菌的筛选及鉴定

1、筛选

以人体粪便为样本,将样本经预处理后,在 20%左右甘油中保存于-80℃冰箱,取出解冻后,混匀样本吸取 0.5 mL 样本加到 4.5 mL,以含有 0.05%半胱氨酸的 0.9%生理盐水进行梯度稀释,选择合适的梯度稀释液涂布在加了 0.05%半胱氨酸的 MRS 平板上,于 37℃培养 48 h,挑取典型菌落至 MRS 平板上划线纯化,挑取单菌落转接至液体 MRS 培养基(含 0.05%半胱氨酸)增菌,30%甘油保藏,得到菌株 CCFM1025 和菌株 F1。

2、鉴定

提取 CCFM1025、F1 的基因组,将 CCFM1025、F1 的 16S rDNA 进行扩增和测序(上海生工生物工程股份有限公司),将该序列在 GenBank 中进行比对,结果显示菌株为粘膜乳杆菌,命名为粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 和粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) F1。

实施例 1-2: 粘膜乳杆菌的培养

将粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 接入 MRS 固体培养基(含 0.05%半胱氨酸)中于 37℃培养 48 h 后,观察其菌落并在显微镜下对其菌体进行观察,发现其菌落为圆形粗糙、透明,其菌体为短杆状。

将粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 接入 MRS 培养基(含 0.05%半胱氨酸)中于 37℃培养 48 h,制作生长曲线,发现其于 37℃下培养 12 h 达到稳定期,同时,观察发现其为异型发酵,可从葡萄糖产酸产气。

将粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 接入 MRS 培养基(含 0.05%半胱氨酸)中分别于 10、15、20、25、30、35、40、45、50℃下培养 48 h 后观察其生长状况,20~35℃生长良好,45℃条件下依旧能够生长,但于 15℃或低于 15℃或 50℃几乎不生长。

将粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 接入 MRS 培养基(含 0.05%半胱氨酸)中于 37℃培养 48 h 后,转入新鲜的 MRS 培养基(含 0.05%半胱氨酸)中,同样条件培养 30 h,6000 g 离心菌体 15 min,0.9%生理盐水洗涤菌体后 6000 g 再次离心 10 min,得到菌体,用 30%蔗糖溶液重悬,冻存在-80℃待用。

实施例 1-3: 粘膜乳杆菌对流感小鼠体重的影响

取体重 20-24 g 的健康 ICR 雌鼠 40 只,随机分成 5 组,5 组分别命名为:空白对照组(Control)、流感模型组(Model)、给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)、灌胃粘膜乳

杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025)、灌胃粘膜乳杆菌 F1 的粘膜乳杆菌干预组 (F1)，每组 8 只。

实验前 2 周，每天给粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天，除空白对照组 (Control) 外，其余 4 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒，当天仍需灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2 mL 生理盐水。

实验第 2 天，给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验的 5 天中，每天灌胃前称重，连续记录五日体重变化，结果如图 1 所示。

由图 1 可知，攻毒后的第 3 天小鼠体重开始出现下降，第 4 天时体重下降最为明显 ($P<0.05$)，与对照组 (Control) 相比，模型组 (Model) 体重下降超过 10%，药物治疗组 (Treatment) 体重下降约 5%，粘膜乳杆菌 F1 干预组体重下降 5.5% 左右，而粘膜乳杆菌 CCFM1025 干预组体重下降仅为 3%。

说明本发明的粘膜乳杆菌 CCFM1025 可显著改善流感小鼠体重减轻症状。

实施例 1-4：粘膜乳杆菌对流感小鼠血液指标的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 40 只，随机分成 5 组，5 组分别命名为：空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌的粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025)、灌胃粘膜乳杆菌 F1 的粘膜乳杆菌干预组 (F1)，每组 8 只。

实验前 2 周，每天给粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天，除空白对照组 (Control) 外，其余 3 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒，当天仍需灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2 mL 生理盐水。

实验第 2 天，给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠，将取出的小鼠血液放置在抗凝管中，轻轻晃动，使血液于抗凝剂充分接触，随后送至动物医院进行血常规分析检测（流感病毒感染初期，大量天然免疫细胞，如中性粒细胞和淋巴细胞会参与防御过程，因此，血常规分析检测重点检测中性粒细胞和淋巴细胞变化），结果如图 2-3 所示。

由图 2-3 可知，与空白组 (Control) 相比，模型组 (Model) 中性粒细胞显著升高，淋巴细胞显著降低，而其余四组则无显著变化。

说明本发明的粘膜乳杆菌 CCFM1025 同利巴韦林药物一样，对机体可起到相同的免疫调节功能。

实施例 1-5：粘膜乳杆菌对流感小鼠呼吸道感染炎症的影响

取体重 20-24 g 的健康 ICR 雌鼠 32 只，随机分成 4 组，4 组分别命名为：空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林的药物治疗组 (Treatment)、灌胃粘膜

乳杆菌的粘膜乳杆菌干预组 (CCFM)、灌胃粘膜乳杆菌 F1 的粘膜乳杆菌干预组 (F1)，每组 8 只。

实验前 2 周，每天给粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天，除空白对照组 (Control) 外，其余 3 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒，当天仍需灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2 mL 生理盐水。

实验第 2 天，给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，空白对照组以及流感模型组 (Control、Model) 灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠，立即取出小鼠左肺置于 4% 多聚甲醛中固定，固定后进行组织病理学切片，切片后对小鼠肺部组织病理学切片进行苏木精-伊红染色，通过专业技术人员对小鼠肺部组织病理学切片进行组织病理评分，结果如图 4 所示。

由图 4 可知，空白组 (Control) 小鼠肺部组织结构较完整，无炎症细胞浸润；模型组 (Model) 小鼠则出现大规模炎症表征，甚至充血情况；治疗组 (Treatment) 和粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 组小鼠肺部则轻度炎症细胞浸润，发生在支气管附近。

以上动物实验表明，流感感染可使小鼠患流感性肺炎，肺部被病毒侵染后，其组织结构被破坏，出现大量炎症浸润；而本发明的粘膜乳杆菌 CCFM1025 可缓解小鼠肺部炎症状况，减轻其肺炎病症，同流感常用药利巴韦林药物治疗组的效果相当。

实施例 1-6：粘膜乳杆菌对流感小鼠肺部病毒载量的影响

取体重 20-24 g 的健康 ICR 雌鼠 40 只，随机分成 5 组，5 组分别命名为：空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌的粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025)、灌胃粘膜乳杆菌 F1 的粘膜乳杆菌干预组 (F1)，每组 8 只。

实验前 2 周，每天给粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2 mL 生理盐水。

实验第 1 天，除空白对照组 (Control) 外，其余 3 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒，当天仍需灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒之后的 4 天继续灌胃，其中，粘膜乳杆菌干预组 (CCFM) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌菌悬稀释液，粘膜乳杆菌 F1 干预组 (F1) 灌胃同样数量的粘膜乳杆菌 F1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2 mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠，处死小鼠后，取小鼠右肺组织置于 1 mL 的 TRIZOL 中，冻存于 -80°C 冰箱备用，提取时将右肺组织样品置冰上融化后，采用经 DEPC 处理的无菌研磨器研磨，加入 200 μL 的氯仿，充分混匀后，于 4°C 、12000 rpm 下离心 10 min，去上清 500 μL ，加入等体积的异丙醇，混匀后，于 4°C 、12000 rpm 下离心 10 min，去上清，加入 75% 的乙醇洗涤 RNA 一次，于 4°C 、12000 rpm 下离心 10 min，去上清后，待酒精挥发干，加入 40 μL 的 DEPC 处理水，溶解 RNA，提取的 RNA 冻存于 -80°C 冰箱备用。

利用 qPCR 法测定病毒载量，以 GAPDH 为内参，采用经典的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算方法，以模型组作为对比处理数据，结果如图 5 所示。

由图 5 可知，药物治疗组 (Treatment) 小鼠肺部病毒载量为模型组的 38.03%，而本发明

的粘膜乳杆菌组干预组 (CCFM1025) 小鼠肺部病毒载量仅为模型组的 16.30%。

以上实验表明, 本发明发的粘膜乳杆菌 CCFM1025 可明显减低流感感染小鼠肺部病毒载量, 存在显著性差异 ($P=0.0022$), 粘膜乳杆菌 F1 组和药物治疗组 (Treatment) 小鼠肺部病毒载量降低均存在显著性 (P 值分别为 0.0309 和 0.0170), 这足以说明本发明的粘膜乳杆菌 CCFM1025 在抵抗病毒侵染方面效果优于流感药物治疗作用。

实施例 2-1: 短双歧杆菌的筛选及鉴定

1、筛选

以人体粪便为样本, 将样本经预处理后, 在 20% 左右甘油中保存于 -80°C 冰箱, 取出解冻后, 混匀样本吸取 0.5mL 样本加到 4.5mL, 以含有 0.05% 半胱氨酸的 0.9% 生理盐水进行梯度稀释, 选择合适的梯度稀释液涂布在加了 0.05% 半胱氨酸的 MRS 平板上, 于 37°C 培养 48 h, 挑取典型菌落至 MRS 平板上划线纯化, 挑取单菌落转接至液体 MRS 培养基 (含 0.05% 半胱氨酸) 增菌, 30% 甘油保藏, 得到菌株 CCFM1026 和菌株 B1。

2、鉴定

提取 CCFM1026、B1 的基因组, 将 CCFM1026、B1 的 16S rDNA 进行扩增和测序 (上海生工生物工程股份有限公司), 将该序列在 GenBank 中进行比对, 结果显示菌株与短双歧杆菌的覆盖率 (Query cover) 均为 100%、相似度 (Ident) 均为 99%, 故判定菌株为短双歧杆菌, 命名为短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 和短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) B1。

实施例 2-2: 短双歧杆菌的培养

将短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 接入 MRS 固体培养基 (含 0.05% 半胱氨酸) 中于 37°C 培养 48 h 后, 观察其菌落, 发现其菌落为圆形白色;

在显微镜下对其菌体进行观察并对其进行染色, 发现其菌体呈短棒状, 革兰氏染色阳性, 亚甲基蓝染色着色不规则, 无芽孢、鞭毛和荚膜, 不运动。

将短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 接入 MRS 液体培养基 (含 0.05% 半胱氨酸) 中于 37°C 培养 48 h, 制作生长曲线, 发现其于 37°C 厌氧条件下培养 30 h 可达稳定期, 利用葡萄糖进行非典型异性乳酸发酵途径。

将短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 于 MRS 培养基 (含 0.05% 半胱氨酸) 中于 37°C 培养 48 h 后, 转入新鲜的 MRS 培养基 (含 0.05% 半胱氨酸) 中, 同样条件培养 30 h, 6000g 离心菌体 15min, 0.9% 生理盐水洗涤菌体后 6000g 再次离心 10min, 得到菌体, 用 30% 蔗糖溶液重悬, 冻存在 -80°C 待用。

实施例 2-3: 短双歧杆菌对流感小鼠体重的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 32 只, 随机分成 4 组, 4 组分别命名为: 空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林的药物治疗组 (Treatment)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026)、灌胃短双歧杆菌 B1 的短双歧干预组 (B1 组), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9CFU 菌量的短双歧杆菌菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组 (Control) 外, 其余 4 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 短双歧杆菌 (CCFM1026) 灌胃 10^9CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验的 5 天中, 每天灌胃前称重, 连续记录五日体重变化, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, 攻毒后的第 3 天小鼠体重开始出现下降, 第 4 天时体重下降最为明显 ($P<0.05$), 与对照组 (Control) 相比, 模型组 (Model) 体重下降超过 10%, 药物治疗组 (Treatment) 体重下降约 5%, 而短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 和短双歧杆菌 B1 组体重下降也仅为 5%。

说明本发明的短双歧杆菌 CCFM1026 和 B1 均可显著改善流感小鼠体重减轻症状。

实施例 2-4: 短双歧杆菌对流感小鼠血液指标的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 40 只, 随机分成 5 组, 5 组分别命名为: 空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026)、灌胃短双歧杆菌 B1 的短双歧干预组 (B1 组), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组 (Control) 外, 其余 4 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 短双歧杆菌 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠, 将取出的小鼠血液放置在抗凝管中, 轻轻晃动, 使血液于抗凝剂充分接触, 随后送至动物医院进行血常规分析检测 (流感病毒感染初期, 大量天然免疫细胞, 如中性粒细胞和淋巴细胞会参与防御过程, 因此, 血常规分析检测重点检测中性粒细胞和淋巴细胞变化), 结果如图 7-8 所示。

由图 7-8 可知, 与空白组 (Control) 相比, 模型组 (Model) 小鼠中性粒细胞和淋巴细胞百分比明显出现异常, 显著异于空白组 (Control) (p 值分别为 0.0015 和 0.0011), 然而短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 和药物治疗组 (Treatment) 小鼠的中性粒细胞和淋巴细胞百分比趋向空白对照组 (Control), 且无显著性差异。

说明本发明的短双歧杆菌同利巴韦林药物效果一样, 可积极参与到小鼠的流感相关免疫调节中, 缓解小鼠流感病症。

实施例 2-5: 短双歧杆菌对流感小鼠呼吸道感染炎症的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 40 只, 随机分成 5 组, 5 组分别命名为: 空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026)、灌胃短双歧杆菌 B1 的短双歧干预组 (B1 组), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组 (Control) 外, 其余 4 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液, 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 短双歧杆菌 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧

杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液，短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠，立即取出小鼠左肺置于 4% 多聚甲醛中固定，固定后进行组织病理学切片，切片后对小鼠肺部组织病理学切片进行苏木精-伊红染色，通过专业技术人员对小鼠肺部组织病理学切片进行组织病理评分，结果如图 9 所示。

由图 9 可知，空白组 (Control) 小鼠肺部组织结构较完整，无炎症细胞浸润；模型组 (Model) 小鼠则出现严重炎症浸润现象，甚至出现局部出血现象；短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 支气管附近出现中度炎症浸润，而治疗组 (Treatment) 和短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 组小鼠肺部则炎症情况相对较轻。

以上动物实验表明，流感感染可使小鼠患流感性肺炎，肺部被病毒侵染后，其组织结构被破坏，出现大量炎症浸润；而本发明的短双歧杆菌可缓解小鼠肺部炎症状况，减轻其肺炎病症，同流感常用药利巴韦林药物治疗组的效果相当。

实施例 2-6：短双歧杆菌对流感小鼠肺部病毒载量的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 40 只，随机分成 5 组，5 组分别命名为：空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026)、灌胃短双歧杆菌 B1 的短双歧干预组 (B1 组)，每组 8 只。

实验前 2 周，每天给短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌菌悬稀释液，短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天，除空白对照组 (Control) 外，其余 4 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒，当天仍需灌胃，其中，短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液，短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天，给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃，其中，短双歧杆菌 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液，短双歧杆菌 B1 干预组 (B1) 灌胃同样数量的短双歧杆菌 B1 菌悬稀释液，其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠，处死小鼠后，取小鼠右肺组织置于 1ml 的 TRIZOL 中，冻存于 -80°C 冰箱备用，提取时将右肺组织样品置冰上融化后，采用经 DEPC 处理的无菌研磨器研磨，加入 200ul 的氯仿，充分混匀后，于 4°C 、12000rpm 下离心 10min，去上清 500 μL ，加入等体积的异丙醇，混匀后，于 4°C 、12000rpm 下离心 10min，去上清，加入 75% 的乙醇洗涤 RNA 一次，于 4°C 、12000rpm 下离心 10min，去上清后，待酒精挥发干，加入 40 μL 的 DEPC 处理水，溶解 RNA，提取的 RNA 冻存于 -80°C 冰箱备用。

利用 qPCR 法测定 MxA 相对表达量 (机体对流感病毒会做出防御反应，以清除入侵病毒，恢复健康，MxA 是其分泌的一种抗病毒蛋白，可有效阻止病毒的复制)，以 GAPDH 为内参，采用经典的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算方法，以模型组作为对比处理数据，结果如图 10 所示。

由图 10 可知，药物治疗组 (Treatment) 小鼠肺部 MxA 表达量为模型组 (Model) 的 2.62 倍，短双歧杆菌 B1 干预组小鼠肺部 MxA 表达量为模型组 (Model) 的 2.67 倍，无显著性差异，而短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 小鼠肺部 MxA 表达量则为模型组 (Model) 的 3.46 倍，可显著提高 MxA 表达量 (p 值为 0.0292)。

以上实验表明，本发明的短双歧杆菌 CCFM1026 可以明显增强流感小鼠免疫能力，促使其 MxA 抗病毒蛋白表达量增加，从而对抗病毒的复制，帮助机体恢复健康，呼吸道炎症明显减轻，效果甚至优于药物治疗。

实施例 3-1：混菌对流感小鼠体重的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 48 只，随机分成 6 组，6 组分别命名为：空白对照组

(Control)、流感模型组(Model)、给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)、灌胃益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组(Control)外, 其余 5 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验的 5 天中, 每天灌胃前称重, 连续记录五日体重变化, 结果如图 11 所示。

由图 11 可知, 攻毒后的第 3 天小鼠体重开始出现下降, 第 4 天时体重下降最为明显($P < 0.05$), 与对照组(Control)相比, 模型组(Model)体重下降超过 10%, 药物治疗组(Treatment)体重下降约 5%, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)体重下降约为 3%, 短双歧杆菌干预组(CCFM1026)体重下降约为 5%, 而菌剂干预组(CCFM1025+1026)小鼠体重下降最小, 为不到 3%, 比药物治疗组(Treatment)、粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)、短双歧杆菌干预组(CCFM1026)干预效果更佳, 足以说明摄入本发明的益生菌混合制剂可明显缓解流感小鼠因流感感冒导致的体重下降。

实施例 3-2: 混菌对流感小鼠血液指标的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 48 只, 随机分成 6 组, 6 组分别命名为: 空白对照组(Control)、流感模型组(Model)、给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)、灌胃益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组(Control)外, 其余 5 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组

(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026),其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天,给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃,其中,粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液,短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液,益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026),其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠,将取出的小鼠血液放置在抗凝管中,轻轻晃动,使血液于抗凝剂充分接触,随后送至动物医院进行血常规分析检测(流感病毒感染初期,大量天然免疫细胞,如中性粒细胞和淋巴细胞会参与防御过程,因此,血常规分析检测重点检测中性粒细胞和淋巴细胞变化),结果如图 12-13 所示。

由图 12-13 可知,在小鼠患流感感冒后,其体内天然免疫细胞的比例会发生不同变化,即模型组(Model)小鼠体内中性粒细胞和淋巴细胞等免疫细胞水平出现不同趋势的变化,显著异于空白对照组(Control),而摄入益生菌的干预组小鼠的各项指标趋于正常值,与空白对照组(Control)无显著性差异,其中,同模型组相比,摄入益生菌组中性粒细胞百分比均下降(Control: 22.60%、CCFM1025+1026: 33.10%、CCFM1025: 35.75%、CCFM1026: 37.10%),相应淋巴细胞百分比提高(Control: 73.70%、CCFM1025+1026 : 63.95%、CCFM1025: 60.56%、CCFM1026: 62.10%),可以看出益生菌混合制剂组(CCFM1025+1026)趋向空白对照组(Control)程度略微强于两个单菌(CCFM1025、CCFM1026)组别,说明小鼠摄入的益生菌可参与到机体的免疫调节中,协助机体共同抵抗流感病毒的入侵,维持机体健康,而混菌制剂的效果优于单菌。

实施例 3-3: 混菌对流感小鼠呼吸道感染炎症的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 48 只,随机分成 6 组,6 组分别命名为:空白对照组(Control)、流感模型组(Model)、给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)、灌胃益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026),每组 8 只。

实验前 2 周,每天给粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液,短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液,益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026),其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天,除空白对照组(Control)外,其余 5 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒,当天仍需灌胃,其中,粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液,短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液,益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026),其余组(Control、Model、Treatment)每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天,给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃,其中,粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液,短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液,益生菌混合制剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃

0.2mL 的 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠, 立即取出小鼠左肺置于 4%多聚甲醛中固定, 固定后进行组织病理学切片, 切片后对小鼠肺部组织病理学切片进行苏木精-伊红染色, 通过专业技术人员对小鼠肺部组织病理学切片进行组织病理评分, 结果如图 14 所示。

由图 14 可知, 空白组(Control)小鼠肺部组织结构较完整, 无炎症细胞浸润; 模型组(Model)小鼠则出现大规模炎症表征, 甚至充血情况; 治疗组(Treatment)和益生菌混合制剂干预组(CCFM1025+1026)小鼠肺部也可观察到一定中轻度的炎症, 但支气管等结构还算完整, 病理程度得到一定程度缓解, 其中, 混合菌剂干预组(CCFM1025+1026)相比两组单菌组, 其支气管的绒毛完整度更好, 周围炎症更少, 尽管各组的病理组织评分相近, 但仍可以说明, 混合菌剂干预组(CCFM1025+1026)可以使流感感染小鼠的呼吸道感染程度得到一定程度的降低, 而混菌制剂的效果优于单菌。

实施例 3-4: 混菌对流感小鼠肺部病毒载量的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 48 只, 随机分成 6 组, 6 组分别命名为: 空白对照组(Control)、流感模型组(Model)、给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)、灌胃益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组(Control)外, 其余 5 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组(Treatment)腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组(CCFM1025)灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组(CCFM1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组(CCFM1025+1026)灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂(益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组(Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠, 处死小鼠后, 取小鼠右肺组织置于 1ml 的 TRIZOL 中, 冻存于 -80°C 冰箱备用, 提取时将右肺组织样品置冰上融化后, 采用经 DEPC 处理的无菌研磨器研磨, 加入 200ul 的氯仿, 充分混匀后, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清 500 μL , 加入等体积的异丙醇, 混匀后, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清, 加入 75%的乙醇洗涤 RNA 一次, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清后, 待酒精挥发干, 加入 40 μL 的 DEPC 处理水, 溶解 RNA, 提取的 RNA 冻存于 -80°C 冰箱备用。

利用 qPCR 法测定病毒载量, 以 GAPDH 为内参, 采用经典的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算方法, 以模型组作为对比处理数据, 结果如图 15 所示。

由图 15 可知, 摄入益生菌的干预组小鼠肺部病毒载量均有所降低, 均低于 50%, 其中, 混合菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 和粘膜乳杆菌干预组显著降低, p 值分别为 0.0097 和 0.0032, 平均值分别为 27.68%、16.3%, 药物治疗组相对病毒载量均值为 38.03%, 以上数据说明, 益生菌混合制剂可显著降低流感感染小鼠肺部病毒载量, 且效果优于药物治疗的效果。

实施例 3-5: 混菌对流感小鼠肺部病毒载量的影响

取体重 20-24g 的健康 ICR 雌鼠 48 只, 随机分成 6 组, 6 组分别命名为: 空白对照组 (Control)、流感模型组 (Model)、给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment)、灌胃粘膜乳杆菌 CCFM1025 的粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025)、灌胃短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026)、灌胃益生菌混合制剂组的菌剂干预组 (CCFM1025+1026), 每组 8 只。

实验前 2 周, 每天给粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂 (益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 1 天, 除空白对照组 (Control) 外, 其余 5 组均在乙醚轻微麻醉后鼻滴法以流感病毒对小鼠进行攻毒, 当天仍需灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂 (益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

实验第 2 天, 给药利巴韦林药物治疗组 (Treatment) 腹腔注射药物利巴韦林进行治疗。

攻毒之后的 4 天继续灌胃, 其中, 粘膜乳杆菌干预组 (CCFM1025) 灌胃 10^9 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025 菌悬稀释液, 短双歧杆菌 CCFM1026 干预组 (CCFM1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026 菌悬稀释液, 益生菌混合制剂组的菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 灌胃 10^9 CFU 菌量的益生菌混合制剂 (益生菌混合制剂中含有 5×10^8 CFU 菌量的粘膜乳杆菌 CCFM1025、 5×10^8 CFU 菌量的短双歧杆菌 CCFM1026), 其余组 (Control、Model、Treatment) 每天灌胃 0.2mL 生理盐水。

攻毒后的第 5 天取血后处死小鼠, 处死小鼠后, 取小鼠右肺组织置于 1ml 的 TRIZOL 中, 冻存于 -80°C 冰箱备用, 提取时将右肺组织样品置冰上融化后, 采用经 DEPC 处理的无菌研磨器研磨, 加入 200ul 的氯仿, 充分混匀后, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清 500 μL , 加入等体积的异丙醇, 混匀后, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清, 加入 75% 的乙醇洗涤 RNA 一次, 于 4°C 、12000rpm 下离心 10min, 去上清后, 待酒精挥发干, 加入 40 μL 的 DEPC 处理水, 溶解 RNA, 提取的 RNA 冻存于 -80°C 冰箱备用。

利用 qPCR 法测定 MxA 相对表达量 (机体对流感病毒会做出防御反应, 以清除入侵病毒, 恢复健康, MxA 是其分泌的一种抗病毒蛋白, 可有效阻止病毒的复制), 以 GAPDH 为内参, 采用经典的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算方法, 以模型组作为对比处理数据, 结果如图 16 所示。

由图 16 可知, 菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 小鼠肺部抗病毒蛋白 MxA 表达量最高, 可达模型组的 5.311 倍, 说明本发明的益生菌混合制剂可有效参与机体对抗流感病毒的过程, 增强其抗病毒蛋白 MxA 的表达量, 共同协助机体抑制病毒复制, 而短双歧杆菌干预组 (CCFM1026) 和粘膜乳杆菌 (CCFM1025) 也可一定程度增加抗病毒蛋白 MxA 的表达量 (分别为模型组的 3.464、3.074 倍), 表达量比药物治疗组 (Treatment) 要多, 但都不如混合菌剂干预组 (CCFM1025+1026) 效果好。

实施例 3-6: 含有混菌的固体饮料的制备

具体步骤如下:

将 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 按照占培养基总质量 5~8% 的接种量接种到培养基中, 于 37°C 的厌氧环境下培养 30 h, 得到培养液; 将培养液离心, 得到菌体; 将菌体用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液清洗 2~4 次后用含 100 g/L 的海藻糖冻干保护剂重悬 (冻干保护剂和菌体的质量比为 2:1), 得到重悬液; 将重悬液真空冷冻法冻干, 得到 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 菌粉;

将粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 按照占培养基总质量 5~8% 的接种量接种到培养基中, 于 37°C 下培养 18 h, 得到培养液; 将培养液离心, 得到菌体; 将菌体用 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液清洗 2~4 次后用含 100 g/L 的海藻糖冻干保护剂重悬 (冻干保护剂和菌体的质量比为 2:1), 得到重悬液; 将重悬液真空冷冻法冻干, 得到粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 菌粉;

将含有 10^{10} CFU 的粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 菌粉和短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 菌粉分别同麦芽糊精 1g 进行混合, 得到富含粘膜乳杆菌 (*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025 和短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) CCFM1026 的固体饮料。

取 10 克此含有粘膜乳杆菌 CCFM1025 和短双歧杆菌 CCFM1026 的固体饮料用 20 毫升的生理盐水复溶, 每只小鼠灌胃 200 微升, 连续两周, 可有效缓解流感小鼠症状, 在治疗和/或预防流感有极好的效果。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上, 但其并非用以限定本发明, 任何熟悉此技术的人, 在不脱离本发明的精神和范围内, 都可做各种的改动与修饰, 因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1.一种益生菌混合制剂,其特征在于,所述益生菌混合制剂含有粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)以及短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*);

所述粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)已于2018年10月11日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No.60460,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼;

所述短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)已于2018年10月11日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No.60459,保藏地址为广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

2.如权利要求1所述的一种益生菌混合制剂,其特征在于,所述益生菌混合制剂中粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL;所述益生菌混合制剂中短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

3.权利要求1或2所述的益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用。

4.如权利要求3所述的益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用,其特征在于,所述产品中,粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*)的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

5.如权利要求3或4所述的益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用,其特征在于,所述产品包含食品、药品或保健食品。

6.如权利要求5所述的益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用,其特征在于,所述药品含有益生菌混合制剂、药物载体和/或药用辅料。

7.如权利要求5所述的益生菌混合制剂在制备预防和/或治疗流感的产品中的应用,其特征在于,所述食品包含使用含有益生菌混合制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品;或所述食品包含含有益生菌混合制剂的固体饮料。

8.一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述产品含有权利要求1-3任一所述的一种具有抗流感能力的益生菌混合制剂。

9.如权利要求8所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述产品中,粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*) CCFM1026的活菌数不低于 1×10^6 CFU/mL。

10.如权利要求8或9所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述产品包含食品、药品或保健食品。

11.如权利要求10所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述药品含有益生菌混合制剂、药物载体和/或药用辅料。

12.如权利要求10所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述食品包含使用含有益生菌混合制剂的发酵剂生产得到的乳制品、豆制品或果蔬制品;或所述食品包含含有益生菌混合制剂的固体饮料。

13.如权利要求12所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品,其特征在于,所述发酵剂的制备方法为将(*Bifidobacterium breve*) CCFM1026按照占培养基总质量5~8%的接种量接种到培养基中,于37°C的厌氧环境下培养30 h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用pH为7.2的磷酸盐缓冲液清洗2~4次后用含100 g/L的海藻糖冻干保护剂重悬,得到重悬液;将重悬液真空冷冻法冻干,得到(*Bifidobacterium breve*) CCFM1026菌粉;

将粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025按照占培养基总质量5~8%的接种量接种到培养基中,于37°C下培养18 h,得到培养液;将培养液离心,得到菌体;将菌体用pH为7.2的磷酸盐缓冲液清洗2~4次后用含100 g/L的海藻糖冻干保护剂重悬,得到重悬液;将重悬液真空冷冻法冻干,得到粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025菌粉;

将得到的粘膜乳杆菌(*Lactobacillus mucosae*) CCFM1025菌粉与短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*) CCFM1026菌粉混合,得到发酵剂;

所述冻干保护剂和菌体的质量比为2:1。

14.如权利要求 13 所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品，其特征在于，所述培养基的 pH 为 6.8。

15.如权利要求 13 或 14 所述的一种用于预防和/或治疗流感的产品，其特征在于，所述保护剂包含 100 g/L 的脱脂奶粉、150 g/L 的海藻糖以及 10 g/L 的 L-谷氨酸钠。

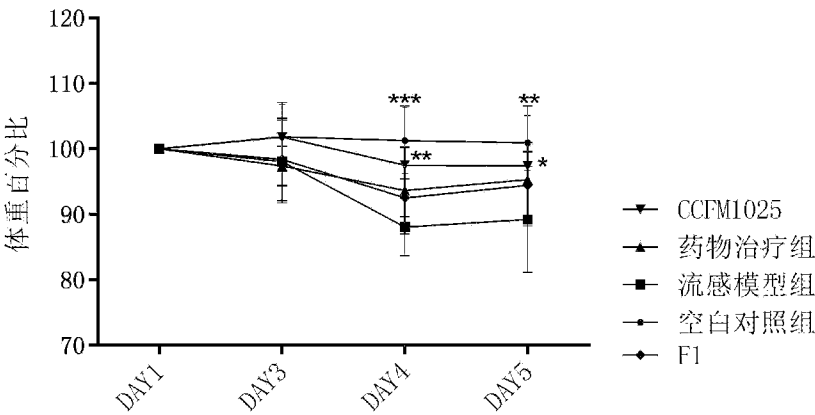


图 1

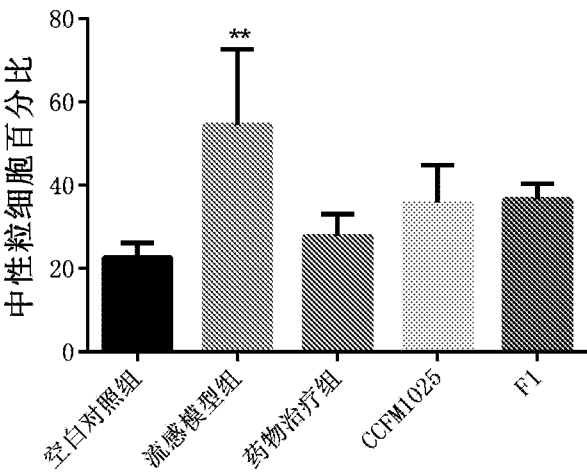


图 2

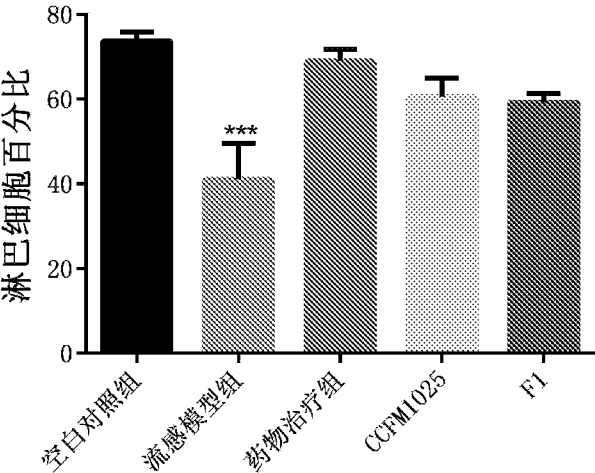


图 3

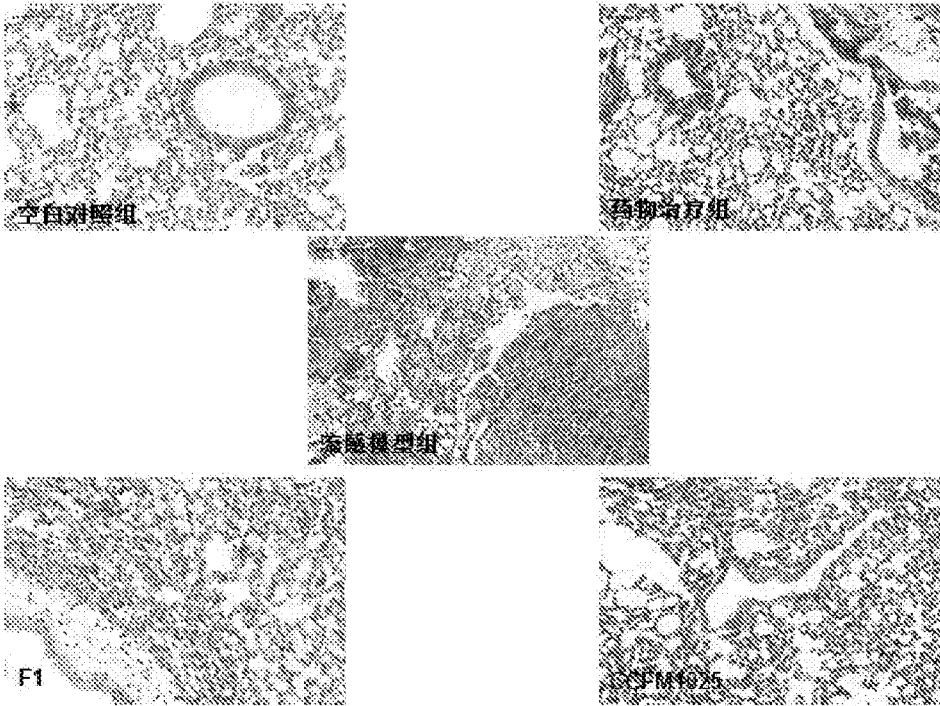


图 4

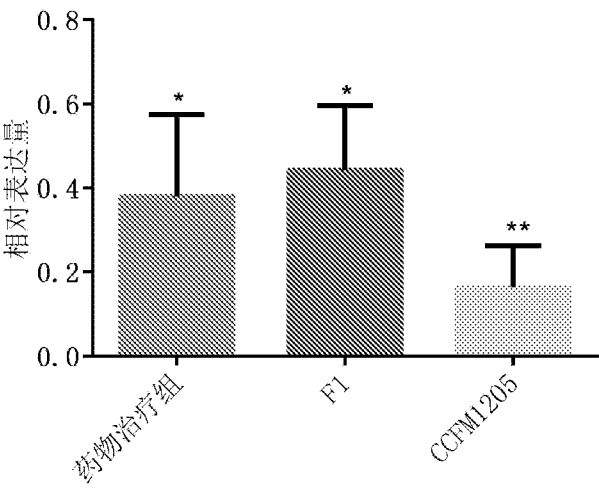


图 5

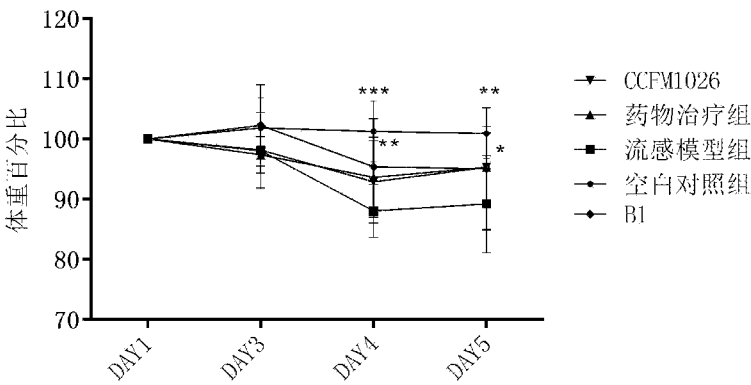


图 6

3/6

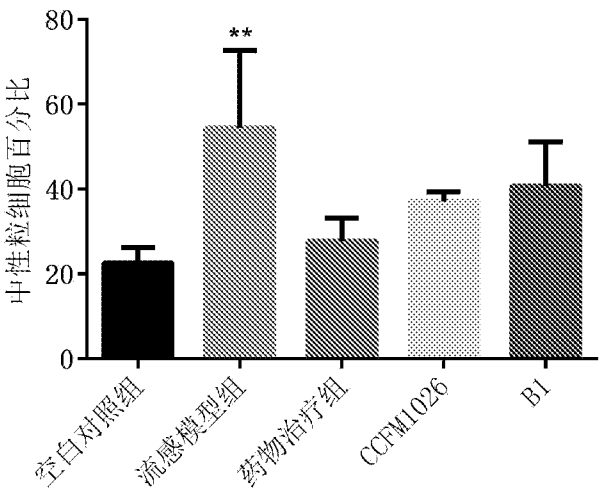


图 7

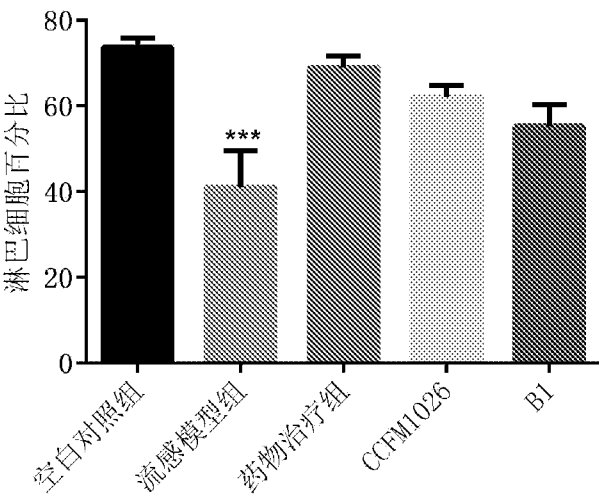


图 8

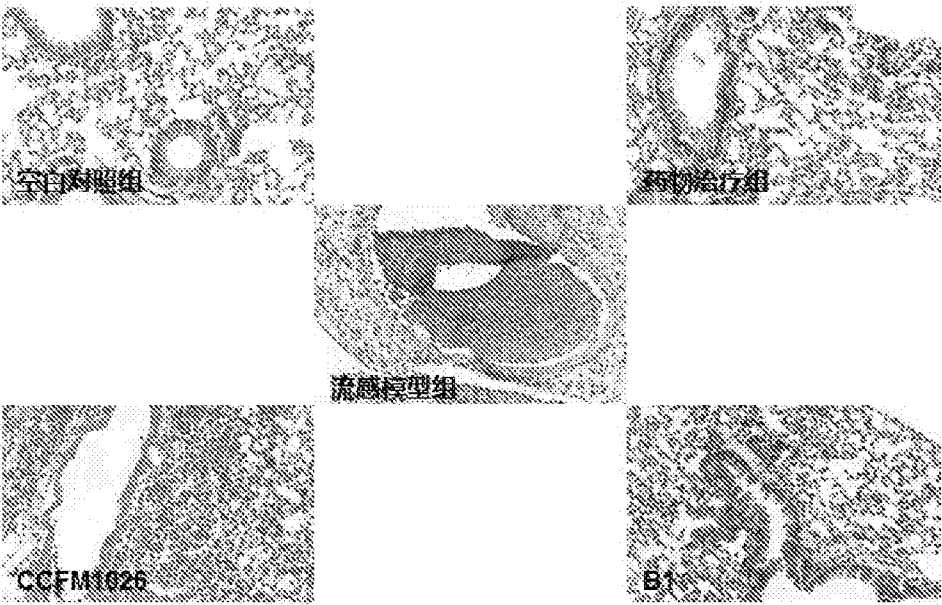


图 9

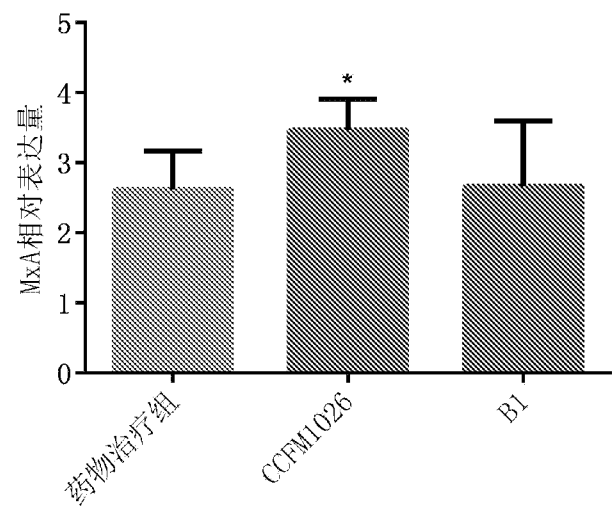


图 10

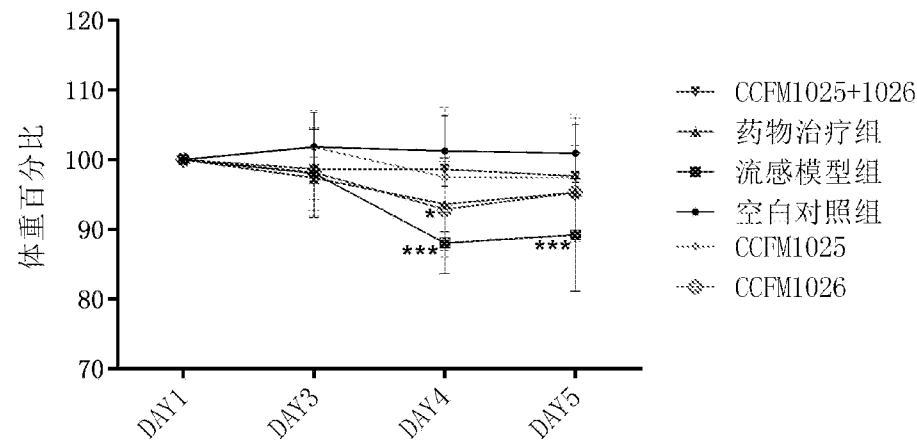


图 11

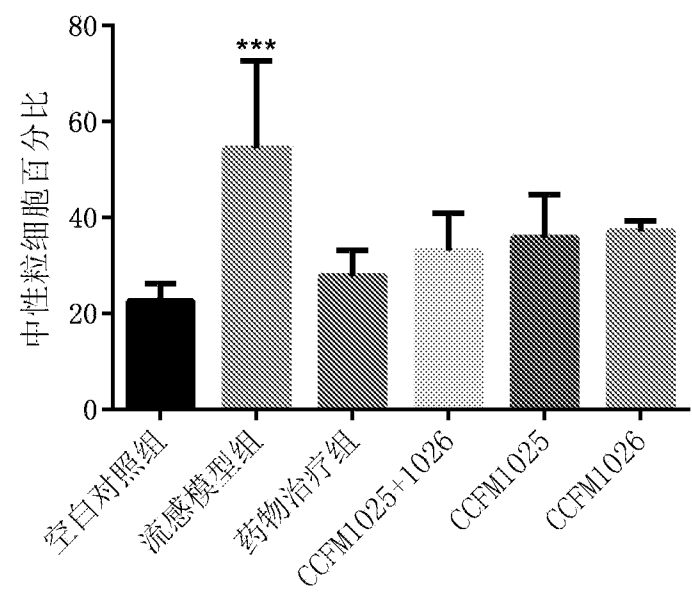


图 12

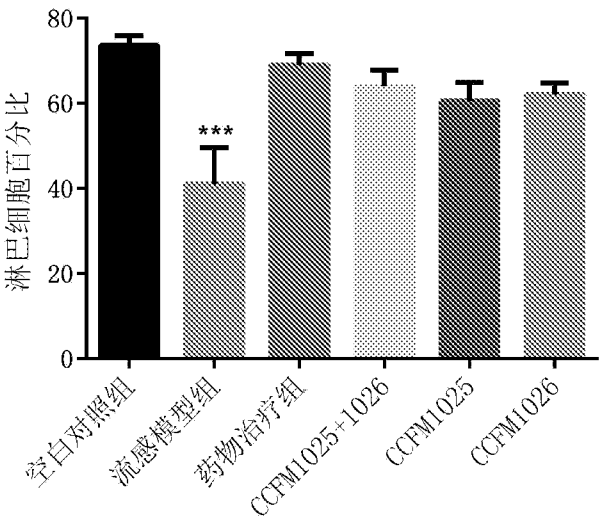


图 13

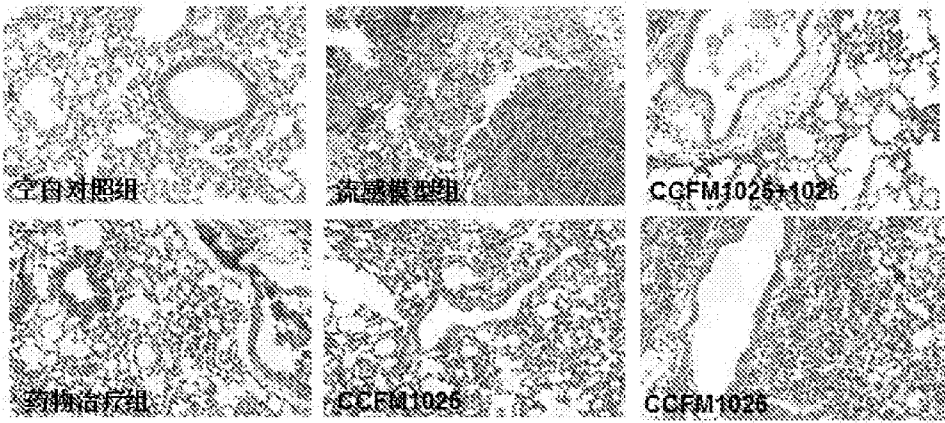


图 14

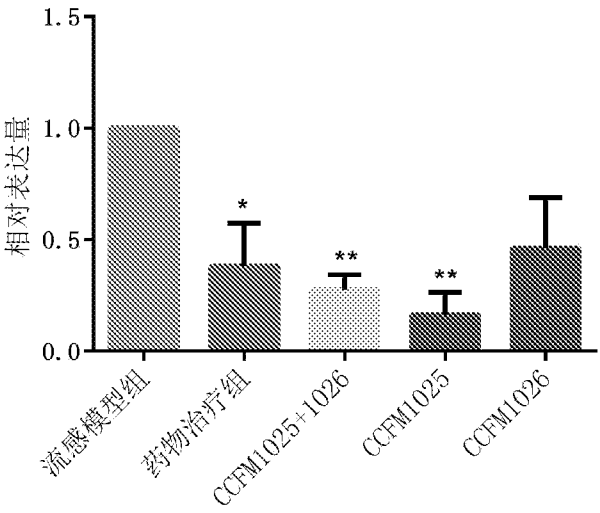


图 15

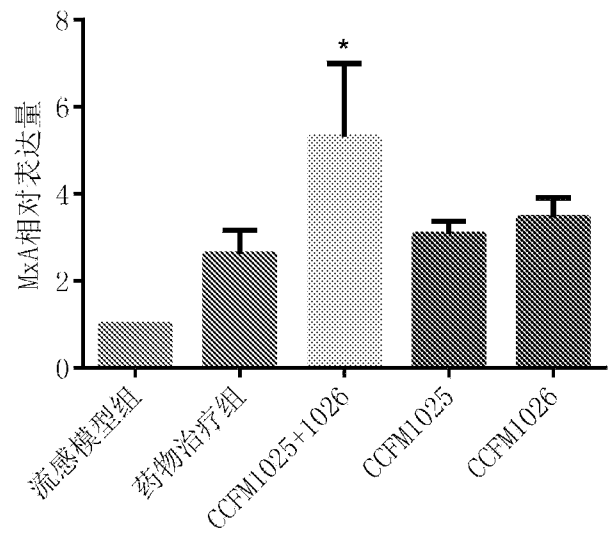


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/082656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; A61K 35/745(2015.01)n; A61K 35/747(2015.01)n; C12R 1/225(2006.01)n; C12R 1/01(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A23L; A61K; A61P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; CNKI; 万方; WANFANG, 百度; BAIDU, VEN; ISI Web of Science; Gene Bank; 中国专利生物序列检索系统; CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM, NCBI; WOTXT; USTXT; EPTXT; CATXT; JPTXT; Patents语义检索, PATENTICS SEMANTIC RETRIEVAL; search based on 1-2, 陆文伟, 陈卫, 翟齐啸, 刘馨阳, 赵建新, 杭锋, 张灏, 江南大学, 流感, 流行性感胃, 粘膜乳杆菌, 短双歧杆菌, GDMCC 60460, GDMCC 60459, CCFM1025, CCFM1026, JIANGNAN UNIVERSITY, LU Wenwei, CHEN Wei, ZHAI Qixiao, LIU Xinyang, ZHAO Jianxin, HANG Feng, ZHANG Hao, influenza, flu, Lactobacillus mucosae, Bifidobacterium breve

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 109576185 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 05 April 2019 (2019-04-05) claims 1-10	1-15
A	WO 2018109730 A1 (SOFAR SPA) 21 June 2018 (2018-06-21) claims 1 and 4-6	1-15
A	CN 108949640 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 07 December 2018 (2018-12-07) entire document	1-15
A	CN 109069558 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 December 2018 (2018-12-21) entire document	1-15
A	CN 101031313 A (ANIDRAL S.R.L.) 05 September 2007 (2007-09-05) entire document	1-15
A	CN 1109763 A (YAKULT HONSHA CO., LTD.) 11 October 1995 (1995-10-11) entire document	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 August 2019

Date of mailing of the international search report

17 September 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/082656**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108653574 A (SANZHU FUER PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 16 October 2018 (2018-10-16) entire document	1-15
A	US 2008274162 A1 (NESSA, J.B. et al.) 06 November 2008 (2008-11-06) entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/082656

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/082656

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109576185	A	05 April 2019	None			
WO	2018109730	A1	21 June 2018	AU	2017377139	A1	04 July 2019
CN	108949640	A	07 December 2018	None			
CN	109069558	A	21 December 2018	JP	2019512473	A	16 May 2019
				WO	2017152137	A3	05 October 2017
				WO	2017152137	A2	08 September 2017
				AU	2017228502	A1	06 September 2018
				EP	3423093	A2	09 January 2019
				US	2018264053	A1	20 September 2018
				GB	2557823	A	27 June 2018
				CA	3016059	A1	08 September 2017
				WO	2017152137	A9	02 November 2017
				WO	2017152137	A8	07 September 2018
				IN	201817035000	A	28 December 2018
CN	101031313	A	05 September 2007	KR	20070089130	A	30 August 2007
				WO	2006054135	A1	26 May 2006
				CN	101031313	B	16 June 2010
				US	9233130	B2	12 January 2016
				ES	2329390	T3	25 November 2009
				JP	2008520640	A	19 June 2008
				EP	1773361	A1	18 April 2007
				EP	1773361	B2	26 September 2012
				BR	PI0517273	A	07 October 2008
				EP	1773361	B1	15 July 2009
				KR	101228608	B1	01 February 2013
				RU	2418063	C2	10 May 2011
				DE	602005015451	D1	27 August 2009
				ES	2329390	T5	11 February 2013
				US	2008107634	A1	08 May 2008
				IN	200700575	P2	06 July 2007
				IN	265622	B	06 March 2015
				IT	1357270	B	10 March 2009
CN	1109763	A	11 October 1995	NZ	264286	A	25 June 1996
				EP	0640349	A1	01 March 1995
				JP	H0761934	A	07 March 1995
				CA	2130612	A1	26 February 1995
				CN	1080299	C	06 March 2002
				JP	3269890	B2	02 April 2002
				AU	687831	B2	05 March 1998
				AU	7143094	A	09 March 1995
CN	108653574	A	16 October 2018	None			
US	2008274162	A1	06 November 2008	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/082656

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; A23L 33/135(2016.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; A61K 35/745(2015.01)n; A61K 35/747(2015.01)n; C12R 1/225(2006.01)n; C12R 1/01(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A23L; A61K; A61P; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;CNKI;万方;百度;VEN;ISI Web of Science;Gene Bank;中国专利生物序列检索系统;NCBI;WOTXT;USTXT;EPTXT;CATXT;JPTXT;Patentics语义检索: 基于序列1-2检索, 陆文伟, 陈卫, 翟齐啸, 刘馨阳, 赵建新, 杭锋, 张灏, 江南大学, 流感, 流行性感, 粘膜乳杆菌, 短双歧杆菌, GDMCC 60460, GDMCC 60459, CCFM1025, CCFM1026, JIANGNAN UNIVERSITY, LU Wenwei, CHEN Wei, ZHAI Qixiao, LIU Xinyang, ZHAO Jianxin, HANG Feng, ZHANG Hao, influenza, flu, Lactobacillus mucosae, Bifidobacterium breve

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 109576185 A (江南大学 等) 2019年 4月 5日 (2019 - 04 - 05) 权利要求1-10	1-15
A	WO 2018109730 A1 (SOFAR SPA) 2018年 6月 21日 (2018 - 06 - 21) 权利要求1、4-6	1-15
A	CN 108949640 A (江南大学) 2018年 12月 7日 (2018 - 12 - 07) 全文	1-15
A	CN 109069558 A (加利福尼亚大学董事会) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 全文	1-15
A	CN 101031313 A (安尼德拉尔有限公司) 2007年 9月 5日 (2007 - 09 - 05) 全文	1-15
A	CN 1109763 A (株式会社雅库路特本社) 1995年 10月 11日 (1995 - 10 - 11) 全文	1-15

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 8月 7日

国际检索报告邮寄日期

2019年 9月 17日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

朱晓

电话号码 (86-512)88996483

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 108653574 A (三株福尔制药有限公司) 2018年 10月 16日 (2018 - 10 - 16) 全文	1-15
A	US 2008274162 A1 (NESSA JEFFREY BRYAN 等) 2008年 11月 6日 (2008 - 11 - 06) 全文	1-15

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/082656

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109576185	A	2019年 4月 5日	无			
WO	2018109730	A1	2018年 6月 21日	AU	2017377139	A1	2019年 7月 4日
CN	108949640	A	2018年 12月 7日	无			
CN	109069558	A	2018年 12月 21日	JP	2019512473	A	2019年 5月 16日
				WO	2017152137	A3	2017年 10月 5日
				WO	2017152137	A2	2017年 9月 8日
				AU	2017228502	A1	2018年 9月 6日
				EP	3423093	A2	2019年 1月 9日
				US	2018264053	A1	2018年 9月 20日
				GB	2557823	A	2018年 6月 27日
				CA	3016059	A1	2017年 9月 8日
				WO	2017152137	A9	2017年 11月 2日
				WO	2017152137	A8	2018年 9月 7日
				IN	201817035000	A	2018年 12月 28日
CN	101031313	A	2007年 9月 5日	KR	20070089130	A	2007年 8月 30日
				WO	2006054135	A1	2006年 5月 26日
				CN	101031313	B	2010年 6月 16日
				US	9233130	B2	2016年 1月 12日
				ES	2329390	T3	2009年 11月 25日
				JP	2008520640	A	2008年 6月 19日
				EP	1773361	A1	2007年 4月 18日
				EP	1773361	B2	2012年 9月 26日
				BR	PI0517273	A	2008年 10月 7日
				EP	1773361	B1	2009年 7月 15日
				KR	101228608	B1	2013年 2月 1日
				RU	2418063	C2	2011年 5月 10日
				DE	602005015451	D1	2009年 8月 27日
				ES	2329390	T5	2013年 2月 11日
				US	2008107634	A1	2008年 5月 8日
				IN	200700575	P2	2007年 7月 6日
				IN	265622	B	2015年 3月 6日
				IT	1357270	B	2009年 3月 10日
CN	1109763	A	1995年 10月 11日	NZ	264286	A	1996年 6月 25日
				EP	0640349	A1	1995年 3月 1日
				JP	H0761934	A	1995年 3月 7日
				CA	2130612	A1	1995年 2月 26日
				CN	1080299	C	2002年 3月 6日
				JP	3269890	B2	2002年 4月 2日
				AU	687831	B2	1998年 3月 5日
				AU	7143094	A	1995年 3月 9日
CN	108653574	A	2018年 10月 16日	无			
US	2008274162	A1	2008年 11月 6日	无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)