



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113817622 B

(45) 授权公告日 2023.05.26

(21) 申请号 202010558485.1

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.18

C12R 1/01 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12R 1/07 (2006.01)

申请公布号 CN 113817622 A

C12R 1/225 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.12.21

C12R 1/46 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12R 1/44 (2006.01)

CCTCC NO:M2019780 2019.10.08

C12R 1/645 (2006.01)

(73) 专利权人 青岛蔚蓝生物股份有限公司

(56) 对比文件

CN 104630099 A, 2015.05.20

地址 266000 山东省青岛市城阳区王沙路

CN 102421889 A, 2012.04.18

1318号企业服务中心108室

M Y Lin等. Antioxidative effect of  
intestinal bacteria *Bifidobacterium*  
*longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus*  
*acidophilus* ATCC 4356 .《*Digestive  
Diseases and Sciences*》.2000, 第45卷(第8  
期), 第1617-1622页.

专利权人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

审查员 马颖

(72) 发明人 段治 崔洪昌 张景燕 郭超群  
张陆霞

权利要求书1页 说明书14页

(51) Int.Cl.

序列表1页 附图4页

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61P 3/06 (2006.01)

(54) 发明名称

一株具有减轻致癌物对人体细胞基因毒性作用的长双歧杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明涉及功能微生物筛选与应用技术领域，具体提供一株新型长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)VHProbi Y08及其应用。所述长双歧杆菌VHProbi Y08筛选自婴幼儿新鲜粪便，保藏号为CCTCC NO:M2019780。该菌株具备在人体细胞中减轻致癌物的基因毒性作用，具有有效的肿瘤预防机制，在防治癌症方面具备一定的价值。

1. 一种长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*), 其特征在于, 所述长双歧杆菌的保藏号为CCTCC NO:M2019780。
2. 权利要求1所述的长双歧杆菌在制备具有降解胆固醇功能的药品中的应用。
3. 权利要求1所述的长双歧杆菌在制备具有预防癌症功能的药品中的应用。
4. 一种益生菌制剂, 包含权利要求1所述的长双歧杆菌。
5. 如权利要求4所述的益生菌制剂, 其特征在于, 所述的益生菌制剂还包含凝结芽孢杆菌、双歧杆菌、乳杆菌、链球菌、乳球菌、明串球菌、丙酸杆菌、酵母菌、片球菌、葡萄球菌中的任意一种或两种或多种的组合。
6. 如权利要求5所述的益生菌制剂, 其特征在于, 所述的双歧杆菌为青春双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、动物双歧杆菌、两歧双歧杆菌中的任意一种或两种或多种的组合。
7. 如权利要求5所述的益生菌制剂, 其特征在于, 所述的乳杆菌为嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌中的任意一种或两种或多种的组合。
8. 如权利要求4或5所述的益生菌制剂, 其特征在于, 所述的益生菌制剂中长双歧杆菌的活菌量至少为 $10^8$ CFU/g。

# 一株具有减轻致癌物对人体细胞基因毒性作用的长双歧杆菌及其应用

## 技术领域

[0001] 本发明涉及功能微生物筛选与应用技术领域,具体涉及一种长双歧杆菌,特别是一株具有减轻致癌物对人体细胞基因毒性作用的长双歧杆菌及其应用。

## 背景技术

[0002] 双歧杆菌是婴儿肠道微生物群中最丰富的成员,在大肠中含量最高,口腔中也有发现。双歧杆菌可通过垂直传播从母亲那里获得,它们在婴儿肠道中持续存在与它们对婴儿肠道中聚糖的持续糖酵解有关。像是青春双歧杆菌和链状双歧杆菌它们在成人体内较为常见,而两歧双歧杆菌、短双歧杆菌和长双歧杆菌则在母乳喂养的婴儿肠道中较为常见。

[0003] 癌症是世界范围内的重大公共健康问题,已经成为当今世界人类健康的最大威胁之一。肿瘤的发生发展是一个十分复杂的医学和生物学问题,受到多种因素的作用。除了遗传因素外,环境因素对肿瘤的发生发展起到了重要的影响作用。流行病学研究认为,绝大多数肿瘤与环境因素相关,外界环境的刺激会导致染色体不稳定,致使宿主具有肿瘤发生易感性。而在所有的环境因素中化学因素引起的恶性肿瘤比例大于90%,远高于物理和生物等其它致癌因素。

[0004] 基因毒性是指能直接或间接造成人体细胞DNA损伤的性质。具有基因毒性的物质可以引起遗传物质突变。自然界中存在多种基因毒性物质,如致癌芳香烃、苯并芘、致癌芳香胺、亚硝酸化合物和黄曲霉毒素等。这些物质广泛存在于自然环境中,如果人体长期暴露在具有基因毒性物质的环境中,则会增加患癌的风险。

[0005] 基因毒性物质的致癌能力可以通过体内动物实验进行评价,这种方法可以直接可靠的表征基因毒性水平,但是耗时长、费用高、不能适应大量筛选的需要。本发明采用了人体活细胞和益生菌共培养的方式来直接鉴定益生菌或其代谢产物在减轻致癌物对人体细胞基因毒性方面的作用效果。微生物可以通过直接吸附或者将基因毒性物质代谢为无毒性的物质,或者增强人体细胞本身的脱毒性能,实现对致癌物和其它对细胞基因有毒害物质的预防作用。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一株新型长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)及其应用。所述长双歧杆菌筛选自婴幼儿粪便,能够有效降低致癌物对人体细胞的基因毒性作用,显示出了肿瘤预防功能,在防治癌症方面具备一定的应用价值。

[0007] 本发明一方面涉及一株长双歧杆菌VHProbi Y08 (*Bifidobacterium longum* VHProbi Y08),已于 2019 年 10 月 8 日保藏于中国武汉大学的中国典型培养物保藏中心,其保藏号为CCTCC NO:M2019780。

[0008] 本发明一方面涉及所述长双歧杆菌在降解胆固醇中的应用。

[0009] 本发明一方面涉及所述长双歧杆菌在预防癌症中的应用。

- [0010] 本发明还涉及一种益生菌制剂,包含上述长双歧杆菌。
- [0011] 所述益生菌制剂还包含芽孢杆菌、双歧杆菌、乳杆菌、链球菌、乳球菌、明串球菌、丙酸杆菌、酵母菌、片球菌、葡萄球菌中的任意一种或两种或多种的组合。
- [0012] 所述芽孢杆菌优选凝结芽孢杆菌。
- [0013] 所述双歧杆菌优选青春双歧杆菌、短双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、动物双歧杆菌、两歧双歧杆菌。
- [0014] 所述乳杆菌优选嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、发酵乳杆菌、保加利亚乳杆菌。
- [0015] 所述链球菌优选嗜热链球菌。
- [0016] 所述乳球菌优选乳酸乳球菌乳酸亚种、乳酸乳球菌乳脂亚种、乳酸乳球菌双乙酰亚种。
- [0017] 所述丙酸杆菌优选费氏丙酸杆菌谢氏亚种、产丙酸丙酸杆菌。
- [0018] 所述明串球菌优选肠膜明串珠菌肠膜亚种。
- [0019] 所述酵母菌优选马克斯克鲁维酵母。
- [0020] 所述片球菌优选乳酸片球菌、戊糖片球菌。
- [0021] 所述葡萄球菌优选小牛葡萄球菌、木糖葡萄球菌、肉葡萄球菌。
- [0022] 所述益生菌制剂中上述长双歧杆菌的活菌量至少为 $10^8$ CFU/g。
- [0023] 本发明还涉及上述益生菌制剂在降解胆固醇中的应用。
- [0024] 本发明还涉及上述益生菌制剂在预防癌症中的应用。
- [0025] 本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08对人工胃液和人工肠液具有很强的耐受性,对红霉素等常见抗生素敏感,生物安全性良好。该菌株抗氧化性能强,对DPPH自由基和HRS自由基的清除率分别达到23.8%和74.5%,其上清液抗脂质过氧化抑制率为41.99%,菌体抗脂质过氧化抑制率为43.17%。该菌株还能有效降解胆固醇,降解率达到20%。
- [0026] 长双歧杆菌VHProbi Y08的细胞黏附指数较高,对小肠上皮细胞的粘附力较强,在肠道中更容易定植并存活下来。该菌株可选择性利用菊糖、FOS、GOS这三种不同类型的益生元,代谢产生不同分子量的蛋白质。这些蛋白质或可在肠道内发挥抵抗病原体,调节免疫、增加矿物质吸收,改善肠道功能,影响代谢和饱腹感等功能,具有重要的潜在益生作用。
- [0027] 长双歧杆菌VHProbi Y08能有效减轻4NQO、IQ等致癌物对人体细胞的基因毒性作用,具有有效的肿瘤预防机制,在预防基因毒性物质引发的癌症方面具备一定的价值。其中,当HT-29细胞单独存在时,受4NQO基因毒性作用,其活性保留率仅为25.1%;而长双歧杆菌VHProbi Y08存在时,HT-29细胞受4NQO基因毒性作用减弱,HT-29细胞的活性保留率达到49.7%;当NCI-H460细胞单独存在时,受4NQO基因毒性作用,其活性保留率仅为49.0%;而在长双歧杆菌VHProbi Y08存在时,NCI-H460细胞受4NQO基因毒性作用减弱,其活性保留率达到88.7%,均得到显著提高。此外,经SOS反应检测后,长双歧杆菌VHProbi Y08 对IQ的平均清除率达到了94%以上,能够显著减轻IQ的基因毒性作用。
- [0028] 本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08作为一株天然来源的益生菌株,对机体本身无毒性,并可大幅度减少致癌物的基因毒性作用,具有重要的应用价值。

## 附图说明

- [0029] 图1为Riboprinter 指纹图谱；
- [0030] 图2为RAPD指纹图谱；
- [0031] 图3为rep-PCR指纹图谱；
- [0032] 图4为长双歧杆菌VHProbi Y08在分别添加有3种益生元和葡萄糖培养基中的生长速率；
- [0033] 图5为长双歧杆菌VHProbi Y08在分别添加有3种益生元和葡萄糖培养基中的代谢产物的MALDI-TOF质谱图；
- [0034] 图6为长双歧杆菌VHProbi Y08细胞黏附图。

## 具体实施方式

[0035] 本发明所述筛选方法并不局限于实施例所述，已知的能够达到筛选目的的方法均可以，实施例的筛选说明只是对本发明的说明，并不是对本发明保护范围的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。

[0036] 下面结合具体实施例，对本发明做进一步阐述。

[0037] 实施例1 菌株的分离与筛选

[0038] 1、双歧杆菌初筛

[0039] 配制BSM (Bifidus Selective Medium Agar) 固体培养基：纯化水1000mL，蛋白胨10g，牛肉浸取物10g，酵母提取物 5.0g，乙酸钠5g，葡萄糖5g，磷酸二氢钾2g，吐温80 1.0mL，柠檬酸二胺 2.0g，碳酸钙20g，七水硫酸镁0. 58g，七水硫酸锰0. 25g，琼脂15g，调 pH 6.2-6.5，121℃高压灭菌15 min。待培养基冷却后分别称取半胱氨酸溶液(100 mg/mL) 5mL和莫匹罗星锂盐溶液(10mg/mL) 5mL添加到琼脂培养基中，摇匀即得BSM固体培养基。

[0040] 取1g 来自0-3岁的半年内未使用过益生菌制剂的婴幼儿新鲜粪便，用0.85%的生理盐水稀释后放入无菌样品袋中，用匀浆仪拍打混匀；取100μL混匀液梯度稀释，涂布于BSM 固体培养基后放入厌氧罐中，37℃培养72h，待平板长出单菌落镜检。根据镜检结果，申请人共筛选出9株潜在双歧杆菌，分别命名为NH-1,NH-2,……,NH-9。

[0041] 2、双歧杆菌复筛

[0042] 配置1L 的BSM液体培养基115℃高压灭菌20min，待培养基冷却后加入3.2g猪粘膜胃蛋白酶，摇匀溶解，置37℃水浴摇床中温水浴1h制成耐酸性培养基。

[0043] 将筛选得到的9株双歧杆菌NH-1,NH-2,……,NH-9，按6%接种量分别接种于上述耐酸性培养基中，37℃厌氧条件下静置培养72h，取发酵液进行菌量计数。

[0044] 结果显示，所述9株双歧杆菌发酵液中活菌量的对数值分别为8.19、8.32、7.76、6.56、6.87、7.62、5.85、6.84、7.74 Log CFU/mL，NH-2菌株经耐酸性培养基复筛后活菌量最多，菌量对数值高达8.32 Log CFU/mL。从而说明，本发明筛选到的NH-2号菌株耐酸能力最高。

[0045] 实施例2 菌株鉴定

[0046] 2.1 菌落形态鉴定

[0047] 将NH-2菌株接种于BSM固体培养基上，37℃厌氧培养72h后，可见NH-2单菌落呈奶

油色,表面略光滑湿润,边缘整齐,菌落直径在1-1.5mm。显微镜下呈杆状,有的一端呈分叉状。

[0048] 2.2 生理生化特性鉴定

[0049] 本实施例中接种液的准备如下:在无菌条件下,取适量新鲜NH-2菌液,5000rpm/min离心5 min,用PBS缓冲液洗2次,再用同体积PBS缓冲液重菌体后稀释50倍,作为接种液。

[0050] 1、盐度耐受性试验

[0051] 在无菌条件下,向96孔板中分别加入190μL盐浓度为1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%的BSM液体培养基,每个盐浓度做3个平行,然后再加入10μL接种液,不接菌的孔作为对照。每孔加入50μL高压灭菌过的石蜡油以防止培养过程中水分蒸发。置于37℃恒温培养,观察培养基是否变浑浊。

[0052] 结果显示,NH-2菌株在1%盐浓度下生长,在2%~8%盐浓度下不生长,最大耐受盐浓度为1%。

[0053] 2、过氧化氢酶实验

[0054] 取新鲜菌液,滴一滴于干净的载玻片上,然后在其上滴加一滴3% 过氧化氢溶液,观察到NH-2菌株不产生气泡,是阴性反应。

[0055] 3、碳源代谢试验

[0056] 本实施例中所用的基础培养基配方如下:

[0057] 蛋白胨 1.5g;酵母提取物 0.6g;吐温80 0.1g;盐溶液 0.5mL;酚红18mg;蒸馏水100mL;pH7.4±0.2。盐溶液成分:MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 11.5g,MnSO<sub>4</sub> • 4H<sub>2</sub>O 2.8g,蒸馏水100mL。

[0058] 配制10g/mL的糖、醇和苷类碳水化合物溶液,并用0.22μm的无菌过滤器进行过滤。在无菌条件下,向96孔板中加入20μL除菌后的碳水化合物溶液,每种碳水化合物4个平行,然后加入170μL灭菌后含酚红的基础培养基,再加入10μL接种液,不接菌反应孔作为对照。每孔加入50μL液体石蜡以防止培养过程中水分蒸发。37℃厌氧培养,以酚红为指示剂,观察培养基颜色变化。具体结果见表1。

[0059] 表1 NH-2菌株碳源代谢结果

[0060]

阿拉伯半乳聚糖	L-阿拉伯糖	D-纤维二糖	D-果糖	α-L-海藻糖	D-半乳糖胺
+	+	-	+	-	-
D-半乳糖	葡萄糖酸钠	菊糖	D-乳糖	D-麦芽糖	D-甘露醇
+	-	+	+	+	-
D-甘露糖	D-松三糖	D-蜜二糖	D-棉子糖	D-核糖	水杨苷
-	+	+	+	+	-
D-山梨醇	D-蔗糖	D-海藻糖	木聚糖	D-木糖	
-	+	-	-	+	

[0061] 注:“+”阳性反应;“-”阴性反应。

[0062] 2.3分子生物学鉴定

[0063] 2.3.1 16s rDNA 基因序列分析

[0064] 1、基因组DNA提取

[0065] 参照天根细菌基因组DNA提取试剂盒(目录号:DP302)操作。

[0066] 2、16s rDNA 基因扩增

[0067] 1) 引物序列:

[0068] 27F:AGAGTTGATCCTGGCTCA;

[0069] 1492R:GGTTACCTTGTACGACTT。

[0070] 2) 反应体系(50 $\mu$ L)

[0071] 表2. 16s rDNA PCR扩增体系

组成成分	反应体积
10×PCR buffer	5 $\mu$ L
dNTPs	4 $\mu$ L
27F	2 $\mu$ L
1492R	2 $\mu$ L
DNA	2.5 $\mu$ L
rTaq	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	34 $\mu$ L

[0073] 3) 电泳验证PCR产物核酸电泳结果为1500bp左右时符合要求。

[0074] 4) PCR产物测序

[0075] 通过测序获得NH-2菌株的16s rDNA序列SEQ ID NO:1,并将该序列在NCBI 数据库中进行比对,初步确定NH-2菌株为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。

[0076] 2.3.2 Riboprinter指纹图谱

[0077] 用一根取菌棒从琼脂培养基平板上沾取已纯化好的单菌落,将其放入有缓冲液的样品管中,用手持搅拌器搅拌使其在缓冲液中悬浮,然后将样品架放入加热器中灭活后放入Riboprinter 系统中,样品经过DNA制备、转膜、成像检测及数据处理后,得到细菌鉴定结果。鉴定结果显示,NH-2菌株为长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*),其Riboprinter指纹图谱结果见图1。

[0078] 2.3.3 RAPD和rep-PCR指纹图谱鉴定

[0079] 1、RAPD指纹图谱鉴定

[0080] 1) 引物序列:M13(5' - GAGGGTGGCGGTCT-3') ;

[0081] 2) RAPD反应体系

[0082] 表3 RAPD反应体系

反应成分	体积
TaqDNA聚合酶(5U/ $\mu$ L)	0.2 $\mu$ L
10×Buffer(含Mg <sup>2+</sup> )	2 $\mu$ L
引物(10 uM)	1 $\mu$ L
dNTPs(2.5 mM)	0.8 $\mu$ L
DNA模板	2 $\mu$ L
无菌双蒸水	14 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ L

[0084] 3) 电泳

[0085] 制备1.5 %的琼脂糖凝胶板,DL2000 DNA Marker作为结果对照,稳压100V电泳80min,最后利用凝胶成像系统检测电泳图.NH-2菌株的RAPD指纹图谱如图2所示。

[0086] 2、rep-PCR指纹图谱

[0087] 1) rep-PCR引物

[0088] GTGGTGGTGGTGGTG。

[0089] 2) rep-PCR的反应体系

[0090] 表4 rep-PCR的反应体系

[0091]

反应成分	体积
r TaqDNA聚合酶	0.2μL
10×Ex Taq DNA Buffer(含Mg <sup>2+</sup> )	2μL
引物(10 uM)	1 μL
dNTPs (2.5 mM)	2μL
DNA模板	2μL
无菌双蒸水	12.8 μL

[0092] 3)电泳

[0093] DL2000 DNA Marker作为结果对照。电压100 V,电泳时间80min检测扩增结果。NH-2菌株的的rep-PCR指纹图谱如图3所示。

[0094] 综上,将NH-2菌株的菌落形态以及生理生化特性结果上传至网站[http://www.tgw1916.net/bacteria\\_logare\\_desktop.html](http://www.tgw1916.net/bacteria_logare_desktop.html),同时结合文献De Clerck E, et al. Systematic and applied microbiology, 2004, 27(1)50公布的结果,进行比对。综合分子生物学的鉴定结果,可以得出结论,NH-2菌株为一株新的长双歧杆菌,将其命名为长双歧杆菌VHProbi Y08(*Bifidobacterium longum* VHProbi Y08)。

[0095] 实施例3 长双歧杆菌VHProbi Y08对人工胃液和人工肠液的耐受性试验

[0096] 3.1人工胃液的配制

[0097] 分别称取蛋白胨 5g、酵母提取物 2.5g、葡萄糖1g和NaCl 2g,加入1000mL蒸馏水,用稀盐酸调pH3.0,然后115℃灭菌20min。然后使用前加入3.2g猪粘膜胃蛋白酶,摇匀溶解,置37℃水浴摇床中温水浴1h,以模拟人体温度。

[0098] 3.2人工肠液的配制

[0099] 分别称取蛋白胨5g、酵母提取物2.5g、葡萄糖1g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.8g和牛胆盐 3.0g,加入77mL 的0.2mol/L的NaOH溶液,定容至1000mL,用稀盐酸或者氢氧化钠溶液调pH6.8±0.1,115℃灭菌20min。然后使用前加入1g胰酶,摇匀溶解,置37℃水浴摇床中温水浴1h,以模拟人体温度。

[0100] 3.2试验方法

[0101] 取2mL新鲜菌液,5000rpm/min 离心5min 收集菌体,菌体用生理盐水洗涤3次,再用2mL 生理盐水重悬,作为接种液。取1mL接种液,加入到24mL人工肠液中,置于37℃水浴摇床(200rpm/min)3h,取样1mL,检测活菌量。

[0102] 活菌计数方法按照国标《GB4789.35-2016-食品微生物检验乳酸菌检验》测定菌量,该菌株经过人工肠液消化后的活菌量(Log CFU/mL)见表5。

[0103] 表5 长双歧杆菌VHProbi Y08经人工胃液和人工肠液消化后的活菌量

[0104]

消化前	人工胃液消化后	人工肠液消化后
8.57+ 0.17	8.01±0.18	4.98+ 0.21

[0105] 从表5可知,本发明筛选到的长双歧杆菌VHProbi Y08经人工胃液和人工肠液消化后,存活率仍分别高达93.5%和58.1%。从而说明该菌株对人工胃液和人工肠液具有很强的耐受性。

[0106] 实施例4 长双歧杆菌VHProbi Y08的溶血性及抗生素耐受性实验

[0107] 1、溶血性实验

[0108] (1)接种液制备:将冷冻保存的长双歧杆菌VHProbi Y08菌株划线接种于BSM固体培养基中,在温度37℃培养24~48h,再经BSM液体培养基传代培养1次后,以5%的接种量把长双歧杆菌VHProbi Y08接种到新鲜的BSM液体培养基中 40℃振荡培养24~48h,获得新鲜的菌液,作为接种液。

[0109] (2)血细胞培养基准备:称取TBS基础培养基的各种组分,溶解,121℃高压灭菌15 min,等培养基冷却到50℃的时候加入5%的无菌脱纤维绵羊血,混匀,倒平板。

[0110] (3)划线培养:将测试菌株划线接种于准备好的血细胞平板,37℃培养箱培养,24 ~ 48h观察测试菌是否有溶血现象。

[0111] 结果显示:长双歧杆菌VHProbi Y08不能生长,血细胞平板没有变化,说明长双歧杆菌 VHProbi Y08不产生溶血素,不能够溶解血细胞。

[0112] 2、抗生素耐受性实验

[0113] (1)抗生素配制:氨苄青霉素、克林霉素、红霉素、庆大霉素、链霉素、四环素、万古霉素均配制成2048 μg/mL的贮存液,-20℃保存备用。使用时将贮存液用BSM液体培养基进行2倍系列梯度稀释成使用液,梯度稀释浓度为1~1024μg /mL共11个梯度。

[0114] (2)接种液制备:取适量新鲜菌液(24~48h,40℃培养),5000rpm 离心5 min ,用无菌生理盐水洗一次,再用同体积生理盐水重悬菌体后稀释50倍,作为接种液。

[0115] (3)微量肉汤稀释法测定抗生素对长双歧杆菌VHProbi Y08的最小抑菌浓度MIC值

[0116] a. 96孔板第1列次加入不含抗生素的BSM液体培养基,作为阴性对照,向第2~12列依次加入190μL含不同浓度抗生素的BSM液体培养基,然后分别接种10μL上述接种液,做3个平行孔,并以1个孔不加菌液作为空白。

[0117] b. 加入50μL石蜡油覆盖防止水分蒸发。

[0118] c. 将96孔板于40℃振荡培养48h后取出,测定OD<sub>600</sub>值,用48h的结果统计抗生素对菌株的MIC值,具体结果见表6。

[0119] 表6 长双歧杆菌VHProbi Y08的抗生素MIC值

[0120]	红霉素		庆大霉素		链霉素		氯苄西林		四环素		克林霉素	
	MIC	R/S	MIC	R/S	MIC	R/S	MIC	R/S	MIC	R/S	MIC	R/S
	1	/	256	/	256	/	2	/	2	/	64	/

[0121] MIC单位μg/mL

[0122] 从表6的结果可以看出,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08对红霉素等常见抗生素敏感,生物安全性良好。

[0123] 实施例5 长双歧杆菌VHProbi Y08抗氧化功能测定

[0124] 1、菌株清除DPPH和羟基自由基(HRS)能力测定

[0125] 1) PBS菌悬液制备

[0126] 将生长状态优良的单菌落接种于3mL的BSM液体培养基中,37℃条件下培养18-20h,以此培养液为接种液,按照2%的接种量接种于50mL的BSM液体培养基中,静置培养18h,获得菌株的培养液。吸取1mL菌液收集菌体后用1mLPBS缓冲液洗涤菌体2遍后再加入2mLPBS溶液重悬菌体备用。

[0127] 2) 菌株清除DPPH自由基能力的测定

[0128] 取1mL待测菌株的PBS菌悬液,加入1mL 0.4 mM的现配的DPPH自由基溶液,混合均匀后置于室温温度下遮光反应30 min,然后测定样品在波长 517nm处的吸光度A样本,测3次平行。对照组样品以等体积PBS溶液和DPPH·乙醇混合液,并以等体积PBS菌悬液和乙醇混合液空白调零。清除率按下列公式计算:清除率%=[ $(A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{对照}}$ ] × 100%。

[0129] 以副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) IMC-4菌株为阳性对照,结果见表7。

[0130] 表7 DPPH自由基清除率

[0131]	菌株	副干酪乳杆菌 IMC-4	长双歧杆菌VHProbi Y08
	清除率%	18.35%	23.80%
	标准差	1.40%	1.20%

[0132] 从表7的数据可以看出,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08能有效清除DPPH自由基,清除率达到23.8%,显著高于副干酪乳杆菌(*L. paracasei*) IMC-4菌株。

[0133] 3) 菌株清除HRS能力的测定

[0134] 将100μL 5mM的水杨酸钠-乙醇溶液,100μL 5mM的硫酸亚铁,500μL去离子水和200 μL乳酸菌PBS菌悬液混匀后加入100μL过氧化氢溶液(3mM),37℃水浴15min后在510nm波长处测量样品吸光度。羟自由基清除率按照下列公式进行计算。

[0135] 清除率%=( $A_{\text{样品}} - A_{\text{控制}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{控制}}) \times 100\%$ ,其中 $A_{\text{控制}}$ 为去离子水替代样品, $A_{\text{空白}}$ 为去离子水替代样品和 $H_2O_2$ 。以副干酪乳杆菌(*L. paracasei*) IMC-4为阳性对照,结果见表8。

[0136] 表8 HRS自由基清除率

[0137]	菌株	副干酪乳杆菌 IMC-4	长双歧杆菌VHProbi Y08
	清除率%	69.94%	74.50%
	标准差	0.60%	3.20%

[0138] 从表8的数据可以看出,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08能有效清除HRS自由基,清除率达到74.5%,显著高于副干酪乳杆菌(*L. paracasei*) IMC-4菌株。

[0139] 2、菌株抗脂质过氧化实验鉴定

[0140] 1) 乳酸菌的培养及发酵上清液、菌体、胞内提取物的制备:

[0141] 乳酸菌在BSM液体培养基中37 ℃培养24 h,传3代后,6000 rpm/min,4 ℃离心10 min,收集上清液即为发酵上清液。收集的菌体用PBS缓冲液(pH 7.4)于6000 r/min 离心10 min,洗涤3次。将菌体重悬于PBS缓冲液,调整菌体浓度为 $1.0 \times 10^9$  cells/mL,获得菌悬液。

[0142] 2) 亚油酸乳化液的制备:0.1mL亚油酸,0.2mL Tween 20,19.7mL去离子水。

[0143] 3) 0.5 mL的PBS溶液(pH 7.4)中加入1 mL亚油酸的乳化液,1 mL FeSO<sub>4</sub> (1%),再加入0.5 mL样品,37℃水浴1.5 h,混合液加入0.2 mL TCA(4%),2 mL TBA(0.8%),100 ℃水浴30 min,迅速冷却,4000 rpm/min离心15 min,收集上清液在532 nm下测吸光度即为A;对照组以0.5 mL蒸馏水代替样品即为A<sub>0</sub>。抑制率/% = ( $A_0 - A$ ) /  $A_0 \times 100\%$

[0144] 注: A为样品组吸光度;A<sub>0</sub>为对照组吸光度。以副干酪乳杆菌(*L. paracasei*) IMC-4为阳性对照,结果见表9。

[0145] 表9 抗脂质过氧化抑制率

菌株	抑制率		标准差	
	上清液	菌体	上清液	菌体
副干酪乳杆菌 IMC-4	45.86%	33.47%	1.23%	4.90%
长双歧杆菌 VHP probi Y08	41.99%	43.17%	1.20%	1.59%

[0147] 从表9的数据可以看出,本发明提供的长双歧杆菌VHP probi Y08的上清液抗脂质过氧化抑制率为41.99%,略低于副干酪乳杆菌IMC-4菌株;而菌体抗脂质过氧化抑制率为43.17%,显著高于副干酪乳杆菌IMC-4菌株。

[0148] 实施例6 长双歧杆菌VHP probi Y08体外胆固醇降解实验

[0149] 1. 胆固醇胶束溶液的配制:准确称取1g 胆固醇,溶于无水乙醇中,并定容至100mL,在无菌条件下用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

[0150] 2. 称取蛋白胨 10.0 g 牛肉膏 10.0 g 酵母膏 5.0 g 柠檬酸氢二铵2.0 g 葡萄糖20.0 g, 吐温80 1.0 mL,乙酸钠 5.0 硫酸镁 0.1 硫酸锰 0.05 ,磷酸氢二钾 2.0 g ,胆盐1g,蒸馏水1000mL调节pH值 7.3,115℃灭菌30min,然后加入胆固醇溶液使胆固醇终浓度为0.1%。

[0151] 按照0.1%的接种量接种新鲜菌液,37℃静止培养48h,然后取0.2mL菌液,加入1.8mL无水乙醇,混匀,静止10分钟,3000转离心5分钟,取上清液用于测定胆固醇含量。胆固醇测定方法按照GB/T 5009.128-2003 〈食品中胆固醇的测定〉。

[0152] 结果显示:本发明提供的长双歧杆菌VHP probi Y08对胆固醇的降解率达到20%。

[0153] 实施例7 长双歧杆菌VHP probi Y08利用3种不同益生元和葡萄糖的代谢试验

[0154] 1. 生长速率试验

[0155] 称取蛋白胨 1.5g;酵母提取物 0.6g;吐温80 0.1g;盐溶液 0.5mL;酚红18mg;蒸馏水100mL,调pH7.4±0.2后121℃高压灭菌15min。分别配制10g/mL的葡萄糖(Glucose)、低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)和菊糖(Inulin)并用0.22μm的无菌过滤器进行过滤。在无菌条件下,向96孔板中加入20μL除菌后的糖溶液,每种糖溶液4个平行,然后加入170μL灭菌后的基础培养基,再加入10μL接种液,不接菌反应孔作为对照。每孔加入50μL液体石蜡以防止培养过程中水分蒸发。放入酶标仪中,37℃厌氧仓中培养,测量吸光度OD<sub>600</sub>。实验结果如图4所示。

[0156] 本发明提供的长双歧杆菌VHP probi Y08 首先在含有菊糖的培养基中OD<sub>600</sub>达到0.6,其次是在含有葡萄糖、FOS和GOS的培养基中,从而说明长双歧杆菌VHP probi Y08首先是在含有菊糖的培养基中出现平台期,其次是在含有葡萄糖、FOS和GOS的培养基中。因此,长双歧杆菌VHP probi Y08在含有菊糖的这种益生元的培养基中生长速率最快,据此可在后期发酵培养过程中添加菊糖这一益生元组分。

[0157] 2. MALDI-TOF-MS检测长双歧杆菌VHP probi Y08在3种不同益生元及葡萄糖培养基中的全蛋白表达

[0158] 称取蛋白胨 1.5g;酵母提取物 0.6g;吐温80 0.1g;盐溶液 0.5mL;酚红18mg;蒸

馏水100mL,调pH7.4±0.2后121℃高压灭菌15min。分别配制10g/mL的葡萄糖(Glucose)、低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)和菊粉(Inulin)并用0.22μm的无菌过滤器进行过滤分别加入培养基中。

[0159] 按照0.1%的接种量在培养基中接种新鲜菌液,37℃静止培养48h后,取少量新鲜菌体以薄膜的形式均匀涂布于靶板上,加1 μL基质溶液覆盖样品,晾干后,将样品靶放入质谱仪进行鉴定。用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,使样品中蛋白质电离,离子在10-20KV电场作用下加速飞过飞行管道,根据到达检测器的飞行时间不同检测蛋白质的分子量。利用Autof ms 1000 分析软件 Autof Analyzer v1.0打开所获得的4个谱图,通过“谱图列表”和“列表标峰”将4个谱图同时呈现在一个列表中,结果如图5所示。

[0160] 从图5可知:除葡萄糖外,长双歧杆菌VHProbi Y08还能代谢利用菊糖、FOS和GOS三种益生元,并且代谢产物中蛋白的种类和数量明显不同。其中,长双歧杆菌VHProbi Y08利用菊糖为益生元时,其代谢产物中各种蛋白的浓度显著高于其他三种益生元;长双歧杆菌VHProbi Y08利用葡萄糖为益生元时,其代谢产物中分子量在5<sub>KD</sub>以下的小蛋白种类较多,而在利用GOS为益生元时,其代谢产物中分子量在6<sub>KD</sub>以上的大蛋白种类较多;长双歧杆菌VHProbi Y08在利用菊糖和FOS为益生元时,其代谢产物中蛋白种类比较相近。

[0161] 分子量约为2693D的蛋白在以葡萄糖、菊糖和FOS为益生元的代谢产物中浓度较高,而在以GOS为益生元的代谢产物中浓度很低;分子量约为3575D的蛋白存在于以菊糖和FOS为益生元的代谢产物中,而在以葡萄糖和GOS为益生元的代谢产物中几乎不存在;此外,分子量约为5385D、6995D和9840D的蛋白在不同益生元的代谢产物中浓度也存在显著差异,推测编码这几种蛋白的基因与代谢有关。

[0162] 上述结果说明:菊糖、FOS、GOS这三种不同类型的益生元能够被长双歧杆菌VHProbi Y08选择性利用,能够促进长双歧杆菌VHProbi Y08的增殖。这种益生菌和益生元的组合或可在肠道中改善结肠细菌的组合和宿主的健康状态。此外,与代谢葡萄糖相比,长双歧杆菌VHProbi Y08在添加有菊糖、FOS、GOS三种不同益生元的培养基中代谢产生了不同分子量的蛋白质,这些蛋白质或可在肠道内发挥抵抗病原体,调节免疫、增加矿物质吸收,改善肠道功能,影响代谢和饱腹感等功能,具有重要的潜在益生作用。

[0163] 实施例8 长双歧杆菌VHProbi Y08细胞黏附性实验

[0164] 培养Caco-2细胞于RPMI 1640(10%胎牛血清,1%抗生素)培养基中,每两天更换培养基直到细胞密度达到80-90%。用0.25%胰蛋白酶溶液消化细胞,并调整细胞浓度为1×10<sup>5</sup>个/mL,并接种于六孔培养板中,在培养板中预先放入18×18mm无菌盖玻片,并置于37℃、95%空气/5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,直到生长成为致密单层细胞。用PBS缓冲液(pH7.2)清洗细胞两次后,每孔加入1mL无抗生素的RPMI培养基和1mL培养好并重悬于PBS中的菌悬液(调整细菌总数为10<sup>8</sup>CFU/mL),混匀后置于5%二氧化碳培养箱中孵育,每株菌有三个平行。培养2h后,取出培养板,用pH 7 .2的PBS缓冲液清洗细胞直至除去未黏附的菌体,加入无水甲醇固定30min后对细胞玻片进行革兰氏染色。在高倍显微镜下随机选取20个视野进行观察,计数100个Caco-2细胞上黏附的乳酸菌个数。黏附指数见表10,长双歧杆菌VHProbi Y08细胞黏附结果见图6。

[0165] 表10 长双歧杆菌VHProbi Y08对HT29细胞黏附指数

菌株	黏附指数CFU/cell	黏附指数CFU/100 cell
----	--------------	------------------

长双歧杆菌VHProbi Y08	2.025	202.5
------------------	-------	-------

[0167] 从表10的结果可以看出,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08的细胞黏附指数较高,说明该菌株对小肠上皮细胞的粘附力较强,在肠道中更容易定植并存活下来,这为其发挥益生特性奠定了基础。

[0168] 实施例9 长双歧杆菌VHProbi Y08减轻致癌物在肠细胞中基因毒性作用实验

[0169] 使用加入10%小牛血清及青霉素和链霉素的基础培养基(BEM)将复苏好的HT-29细胞在37℃条件下CO<sub>2</sub>培养箱中孵育贴壁90%以上。然后使用PBS缓冲液洗涤细胞2次,再使用Trypsin-EDTA(0.05%trypsin和0.53mM EDTA)消化细胞,再加入BEM培养基,离心收集细胞。

[0170] 将长双歧杆菌以3%的接种量接种于200mL的BSM液体培养基中,37℃条件下厌氧培养12h至菌液浑浊。培养液6000r/min 离心10min收集菌体,菌体用生理盐水洗涤2次后重悬于50mL生理盐水制成菌悬液调整其浓度为10<sup>9</sup>CFU/mL备用。

[0171] 4NQO是一种硝基芳香类的毒性物质,是一种很强的化学诱变剂和致癌物,能够与DNA链形成加合物诱发肿瘤的形成,制备4μg/mL的4NQO工作液备用。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)是一种水溶性的黄色染料,经过活细胞胞内线粒体琥珀酸脱氢酶的作用后会转变成不溶性的紫色甲臜,而活细胞并无此功能,使用二甲基亚砜(DMSO)能够溶解紫色甲臜,并且在570nm有最大吸光度,可以间接反应活细胞的数量。在一定细胞范围内,MTT转变成紫色甲臜形成量与活细胞的数成正比。

[0172] 因此,在含有BEM培养基的深孔板中加入HT-29细胞,并调整细胞数为10<sup>4</sup>个/孔,过夜培养16-18h。在深孔板中加入1mL菌悬液后再加入1mL的4NQO工作液。培养12h后,将上清液吸出然后加入2mL的BEM培养基并加入1mL的MTT。将混合物在37℃培养4h,吸出上清液后加入200uL的DMSO然后在570nm下测量吸光度,计算长双歧杆菌VHProbi Y08抑制4NQO对HT-29细胞造成的基因毒性作用,即细胞活性保留率。

[0173] 细胞活性保留率(%) = (A<sub>570</sub>-C<sub>570</sub>) / (B<sub>570</sub>-C<sub>570</sub>) × 100%。其中,A<sub>570</sub>为添加有4NQO和长双歧杆菌VHProbi Y08 反应后培养基的吸光度,B<sub>570</sub> 为空白培养基的吸光度,C<sub>570</sub>为添加有4NQO的培养基吸光度。

[0174] 实验结果显示,HT-29细胞单独存在时,受4NQO基因毒性作用,其活性保留率仅为25.1%;而长双歧杆菌VHProbi Y08存在时,HT-29细胞受4NQO基因毒性作用减弱,HT-29细胞的活性保留率达到49.7%,得到显著提高。从而说明,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08能显著抑制4NQO对HT-29细胞造成的基因毒性作用。

[0175] 实施例10 长双歧杆菌VHProbi Y08减轻致癌物在肺细胞中基因毒性作用实验

[0176] 使用加入10%小牛血清及青霉素和链霉素的基础培养基(BEM)将复苏好的NCI-H460细胞在37℃条件下CO<sub>2</sub>培养箱孵育贴壁90%以上。然后使用PBS缓冲液洗涤细胞2次,再使用Trypsin-EDTA(0.05%trypsin和0.53mM EDTA)消化细胞,再加入BEM培养基,离心收集细胞。

[0177] 将长双歧杆菌以3%的接种量接种于200mL的BSM液体培养基中,37℃条件下厌氧培养12h至菌液浑浊。培养液6000r/min 离心10min收集菌体,菌体用生理盐水洗涤2次后重悬于50mL生理盐水制成菌悬液调整其浓度为10<sup>9</sup>CFU/mL备用。

[0178] 在含有BEM培养基的深孔板中加入NCI-H460细胞，并调整细胞数为 $10^4$ 个/孔，过夜培养16-18h。在深孔板中加入1mL菌悬液后再加入1mL的4NQO工作液。培养12h后，将上清液吸出然后加入2mL的BEM培养基并加入1mL的MTT。将混合物在37℃培养4h，吸出上清液后加入200uL的DMSO然后在570nm下测量吸光度，计算长双歧杆菌VHProbi Y08抑制4NQO对NCI-H460细胞造成的基因毒性作用，即细胞活性保留率。

[0179] 细胞活性保留率(%) =  $(A_{570} - C_{570}) / (B_{570} - C_{570}) \times 100\%$ 。其中， $A_{570}$ 为添加有4NQO和长双歧杆菌VHProbi Y08反应后培养基的吸光度， $B_{570}$ 为空白培养基的吸光度， $C_{570}$ 为添加有4NQO的培养基吸光度。

[0180] 实验结果显示，NCI-H460细胞单独存在时，受4NQO基因毒性作用，其活性保留率仅为49.0%；而在长双歧杆菌VHProbi Y08存在时，NCI-H460细胞受4NQO基因毒性作用减弱，其活性保留率达到88.7%，得到显著提高。从而说明，本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08能显著抑制4NQO对NCI-H460细胞造成的基因毒性作用。

[0181] 实施例11 SOS反应检测长双歧杆菌VHProbi Y08 减轻致癌物基因毒性作用实验

[0182] SOS显色反应在评价乳酸菌脱基因毒性作用上具有操作简便，灵敏度高且特异性强的优点。其原理是具有基因毒性作用的物质能使指示菌株大肠杆菌PQ37启动半乳糖苷酶基因的转录、翻译和表达，并根据颜色反应来判断DNA是否受损伤及损伤程度。大肠杆菌PQ37用sfia: lacZ融合基因代替了正常的lacZ基因，因此β-半乳糖苷酶的活性严格受sfia基因表达的影响。另外uvrA突变使菌体失去了剪切修复的能力，因此指示菌对DNA损伤试剂更为敏感。Rfa突变使菌体缺乏脂多糖，使待检测致癌物更容易渗透进入细胞。因此可根据诱导β-半乳糖苷酶的表达量和碱性磷酸酶的表达量来检测指示菌的SOS应答活性，根据SOS诱导因子(IFsos)的大小来检测样品的基因毒性强弱。2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]喹啉(简称IQ)是一种杂环芳烃化合物，尤其鱼类和肉类在炙烤、高温蒸煮中容易产生IQ。2017年，世卫组织将IQ列为2A类致癌物。

[0183] 1、试剂配制

[0184] M63培养基：琼脂15g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.6g，(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g，FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5mg，MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g/L 蒸馏水，用KOH调节pH值为7。

[0185] SOS点试验中无代谢活性STA培养基：乳糖(20%) 2mL，葡萄糖(20%) 0.5mL，色氨酸(1%) 2mL，苏氨酸(1%) 2mL，组氨酸(1%) 2mL，尿嘧啶(1%) 2mL，硫胺素(1%) 2mL，氨苄青霉素(10mg/mL) 2mL，X-gal(20mg/mL DMSO) 2mL 过滤除菌，加到1L M63 培养基中。

[0186] SOS 显色反应的缓冲溶液和试剂：B buffer: Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> 16.1g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O 5.5g, KC1 0.75g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.25g, SDS 1g, β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol) 2.7mL, 用蒸馏水配成1L溶液，pH调至7；P buffer: 羟甲基氨基甲烷tris(hydroxymethyl) aminomethane (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) : 121g, SDS 1g, 用蒸馏水配成 1L 溶液, 用盐酸调 pH 至 8.8; ONPG (4mg/mL) : 400mg ONPG加到100mL的pH7 buffer中; pH7 buffer: 61mL 0.1mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 39mL 0.1mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O; PNPP 溶液(4mg/mL) : 400mg PNPP 加到100mL P buffer;

[0187] SOS 反应用到的其他试剂: 1mol/L NaCO<sub>3</sub>, 2.5mol/L HC1, 2mol/L Tris溶液。

[0188] 反应标准程序

[0189] 取1 mL指示菌大肠杆菌PQ 37菌液到9 mL新鲜的La培养基中以作无代谢活性的评

价。取0.6 mL到EP管中,加待测化合物(IQ),37℃震荡培养2h。从每一管分别取0.3mL加至另一EP管中,离心,洗涤,重悬至0.3mL相应缓冲溶液中。其中一列(X系列)作 $\beta$ -半乳糖苷酶反应,另一系列(Y系列)做碱性磷酸酶反应,两个反应可以同时做。

[0190]  $\beta$ -半乳糖苷酶反应:X-系列管中加2.7mL B buffer,37℃保温5~10min。每管加0.6 mL 4mg/ mL ONPG ( $\beta$ -半乳糖苷酶底物: $\beta$ -D-半乳糖苷) 溶液,反应10~90min,加2 mL 1mol/L的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>终止反应。可以根据具体情况调整反应时间使A<sub>420</sub>的时间在0.1~0.4。以无指示菌的阴性对照为空白读作A<sub>420</sub>的值。

[0191] 碱性磷酸酶反应:Y-系列管中加2.7mL P buffer,37℃保温5~10min。每管加0.6 mL 4mg/ mL PNPP(碱性磷酸酶底物:p-硝基苯磷酸二钠盐)溶液,反应10~90min,加1 mL 2.5mol/L 的HCl 终止反应,此时颜色消失。放置5min后加入1mL 2mol/L的Tris (hydroxymethyl) aminomethane使颜色恢复,颜色在几小时内保持稳定。可以根据具体情况调整反应时间使 A<sub>420</sub> 的时间在0.1~0.4。以无菌阴性对照为空白读作A<sub>420</sub>的值。

[0192] 结果表达:酶单位=1000×A<sub>420</sub>/t。式中,A<sub>420</sub>为420nm 处的读数;t为底物(ONPG 或PNPP)的保温时间。

[0193] 在蛋白合成受抑制时,致癌物对sfii A基因的诱导可以用 $\beta$ -半乳糖苷酶与碱性磷酸酶的比值 R 反映。

[0194] R= $\beta$ -半乳糖苷酶活性单位/碱性磷酸酶活性单位=(A<sub>420</sub>B×tP)/(A<sub>420</sub>P×tB)。

[0195] 其中,A<sub>420</sub>B、tB 以及 A<sub>420</sub>P、tP分别代表 $\beta$ -半乳糖苷酶活性和碱性磷酸酶在 t 时间的A<sub>420</sub>的值。

[0196] 引入诱导指数(Ic)这一参数,诱导指数是基因致癌物质浓度为 c 时的R 值R(c)与浓度为0 时R 值R(0)的比值。

[0197] 将长双歧杆菌VHProbi Y08以3%的接种量接种于200mL的BSM液体培养基中,37℃条件下厌氧培养24h至菌液浑浊。培养液6000r/min 离心10min收集菌体,菌体用生理盐水洗涤2次后重悬于50mL生理盐水制成菌悬液调整其浓度为10<sup>9</sup>CFU/mL备用。

[0198] 用1mL注射器加1mL IQ溶液(100mg/L)至4mL的待测菌液中,摇匀后水平放置于37℃空气振荡培养箱中,150rpm/min 振荡培养3h。共培养液12000r/min 离心3min,小心留取上清液。SOS 显色反应测定上清液残余的IQ基因毒性作用。同时以生理盐水作为阴性对照,以不加菌液的IQ溶液作为阳性对照。

[0199] 基因毒性残余率(%)=(IF<sub>X</sub>-1)/(IF<sub>IQ</sub>-1)×100

[0200] 基因毒性清除率(%)=(1-残余率)×100

[0201] IF<sub>X</sub>为IQ-长双歧杆菌VHProbi Y08 共培养后 SOS 反应的诱导因子,IF<sub>IQ</sub>为阳性对照IQ SOS 反应的诱导因子,1 为阴性对照(生理盐水)的诱导因子。

[0202] 试验数据取三个平行的平均值,每次试验独立重复三次。阴性对照、阳性对照和长双歧杆菌VHProbi Y08 SOS反应中 $\beta$ -半乳糖苷酶与碱性磷酸酶的酶活见表11。

[0203] 表11 长双歧杆菌VHProbi Y08 SOS标准反应程序酶活

[0204]

		重复 1		重复 2		重复 3	
项目		ONPG	PNPP	ONPG	PNPP	ONPG	PNPP
阴性对照	平行 1	0.025	0.294	0.008	0.205	0.072	0.156
	平行 2	0.028	0.339	0.005	0.184	0.075	0.112
	平行 3	0.028	0.306	0.007	0.191	0.083	0.143
阳性对照	平行 1	0.524	0.245	0.422	0.185	0.679	0.112
	平行 2	0.522	0.280	0.455	0.198	0.639	0.119
	平行 3	0.484	0.281	0.457	0.187	0.598	0.118
Y08	平行 1	0.289	0.328	0.033	0.187	0.082	0.153
	平行 2	0.462	0.334	0.035	0.175	0.084	0.157
	平行 3	0.528	0.286	0.025	0.186	0.075	0.147
Y08 基因毒性清除率		99.7%		94.2%		99.7%	

[0205] 从表11的数据可以看出,经SOS反应检测后,长双歧杆菌VHProbi Y08 对IQ的平均清除率达到了94%以上,能够显著减轻IQ的基因毒性作用。

[0206] 综上,本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08 在体外细胞模型实验中展现出了较强的黏附能力,这对于防止长双歧杆菌VHProbi Y08因消化道收缩而被快速排出体外,服用后在胃肠道中保持一定的数量,从而发挥益生功能奠定了基础。此外,本发明通过细胞实验和SOS反应证实了长双歧杆菌VHProbi Y08能够显著减轻4NQO和IQ这两类致癌物的基因毒性作用。从而说明,长双歧杆菌VHProbi Y08具备在人体细胞中减轻致癌物的基因毒性作用,具有有效的肿瘤预防机制,在防治癌症方面具备一定的价值。

[0207] 双歧杆菌作为婴幼儿消化道中最丰富的肠道菌群之一,对婴幼儿机体健康发挥了重要作用,同时作为我国可食用的菌种之一,长双歧杆菌的安全性已经获得广泛的认可。本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08符合法规要求,可以作为一种食品原料来源使用,长期服用不会有副作用及过量的风险。经多相分类学鉴定证实,长双歧杆菌VHProbi Y08为一株新的长双歧杆菌,具有脱除4NQO和IQ基因毒性的潜在益生特性。由于近百年来的工业化快速发展,当前食品原料、水源、空气等人类生存要素中存在着各种致癌物,如烧烤食物中有较高含量的苯并芘,它是一种强致癌物,经常食用含苯并芘的食物,致癌物质就会在体内积累,有诱发胃癌、肠癌的风险;在土壤中广泛存在的硝基芳香类化合物及偶氮染料,是典型的间接致癌物,等等。这些致癌物质广泛的存在于人类生存环境当中,人体患癌风险增加。本发明提供的长双歧杆菌VHProbi Y08作为一株天然来源的益生菌株,对机体本身无毒性,并可大幅度减少致癌物的基因毒性作用,具有重要的应用价值。

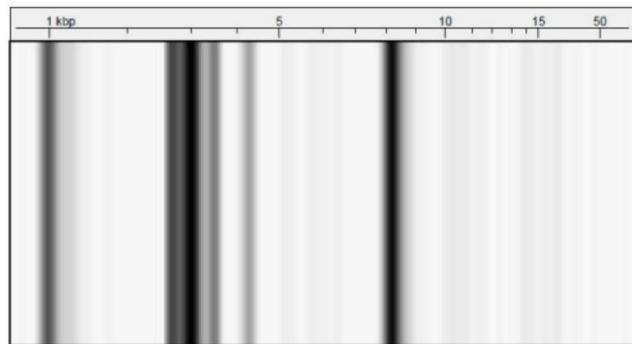
[0208] 申请人已于 2019 年 10 月 8 日将所述长双歧杆菌VHProbi Y08 (*Bifidobacterium longum* VHProbi Y08) 保藏于中国武汉 武汉大学的中国典型培养物保藏中心,其保藏号为CCTCC NO:M2019780。

- [0001] 序列表  
[0002] <110> 青岛蔚蓝生物股份有限公司  
[0003] 青岛蔚蓝生物集团有限公司  
[0004] <120> 一株具有减轻致癌物对人体细胞基因毒性作用的长双歧杆菌及其应用  
[0005] <160> 1  
[0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 1380  
[0009] <212> DNA  
[0010] <213> 长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)  
[0011] <400> 1  
[0012] cccacaaggg gttaggccac cggttcggg tgctgcccac tttcatgact tgacggcgg 60  
[0013] tgtgtacaag gcccggaaac gcattcaccc cgacgttgc gattcgat tactagcgac 120  
[0014] tccgccttca cgcagtcgag ttgcagactg cgatccgaac tgagaccgtt ttccagggat 180  
[0015] ccgcctccgcg tcgccccgtc gcatcccggt gtaccggcca ttgttagcatg cgtgaagccc 240  
[0016] tggacgttaag gggcatgatg atctgacgtc atccccacct tcctccgagt taaccccgac 300  
[0017] ggtccccgtt gagttcccg catabccgc tggcaacacg gggcgagggt tgcgctcggt 360  
[0018] gcggaactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac gaccatgcac cacctgtgaa 420  
[0019] cccgcggcga agggaaagccg tatctctacg accgtcggtt acatgtcaag cccaggttaag 480  
[0020] gtttttcgcg ttgcatacgaa ttaatccgc tgcctcccg cttgtcggtt ccccggtcaa 540  
[0021] ttcttttgat tttagcctt gcggccgtac tccccaggcg ggatgtttaa cgcgttagct 600  
[0022] ccgacacggaa acccggttggaa cggggccac atccagcatc caccgttac ggcgtggact 660  
[0023] accagggttat ctaatccgtt tcgcctccca cgcttcgtc cctcagcgac agtaacggcc 720  
[0024] cagagacctg ctttcgcatt tgggtttttt cccgatatct acacattcca ccgttacacc 780  
[0025] gggaaattcca gtctcccta ccgcactcaa gcccggccgtt acccgccgcg gatccaccgt 840  
[0026] taagcgatgg actttcacac cggacgcgac gaaccgccta cgagccctt acgcccata 900  
[0027] attccggata acgcttgcac cctacgtatt accgcggctg ctggcacgtt gttttccgtt 960  
[0028] gcttattcaa cgggtaaact cactctcgct tgctcccgaa taaaagaggt ttacaacccg 1020  
[0029] aaggcctcca tccctcacgc ggcgtcgctg catcaggctt ggcggccattt tgcaatattc 1080  
[0030] cccactgctg cttcccgtag gagtctggc cgtatctcag tcccaatgtt gccggcgcc 1140  
[0031] ctctcaggcc ggcttccgtt cgaagccacg gtggccgtt accccggccgtt caagctgata 1200  
[0032] ggacgcgacc ccatccata ccgcgaaagc ttcccgatggaa gaccatgcga tcaactggag 1260  
[0033] catccggcat taccacccgtt ttccaggagc tattccgggtt tatggggcag gtcgggtcacc 1320  
[0034] cattactcac ccgttcggca ctctcaccac caagcaagct tggatggatcc cgttcgactg 1380

**DuPont?RiboPrinter?System**  
Sample NH-2 Report



Process	KHA
Enzyme	EcoRI
Label	NH-2
Sample Comment	



	Type	Number	Similarity	Label	1 kbp	RiboPrint?Pattern	15 50
1	DuPont ID	DUP-16555	0.85	Bifidobacterium longum			
2	RiboGroup	NH-2	1.00				

图1

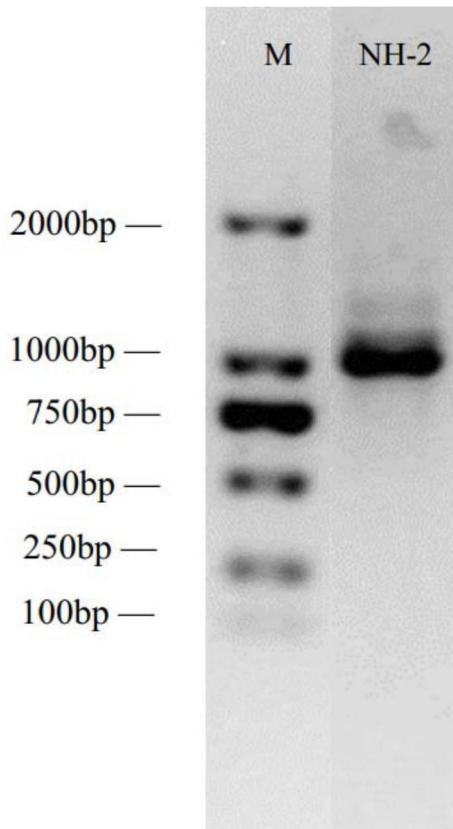


图2

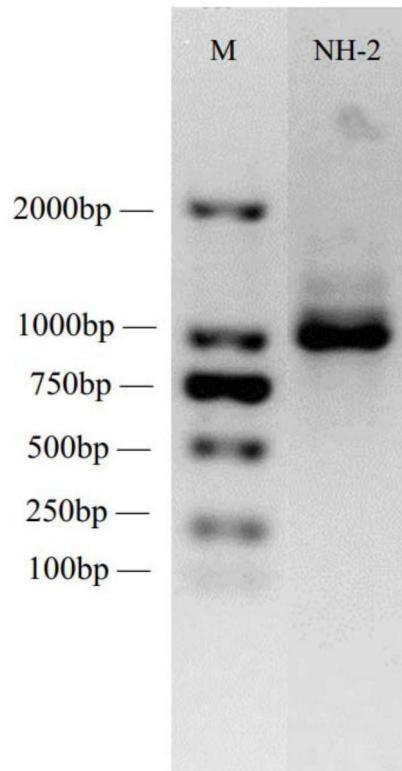


图3

## 在3种益生元和葡萄糖下的生长对比

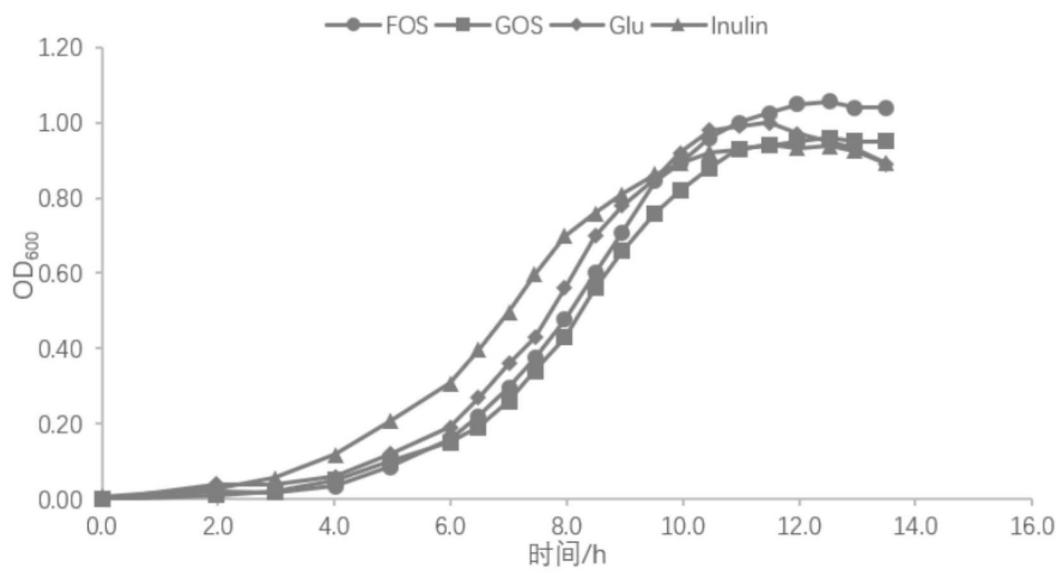


图4

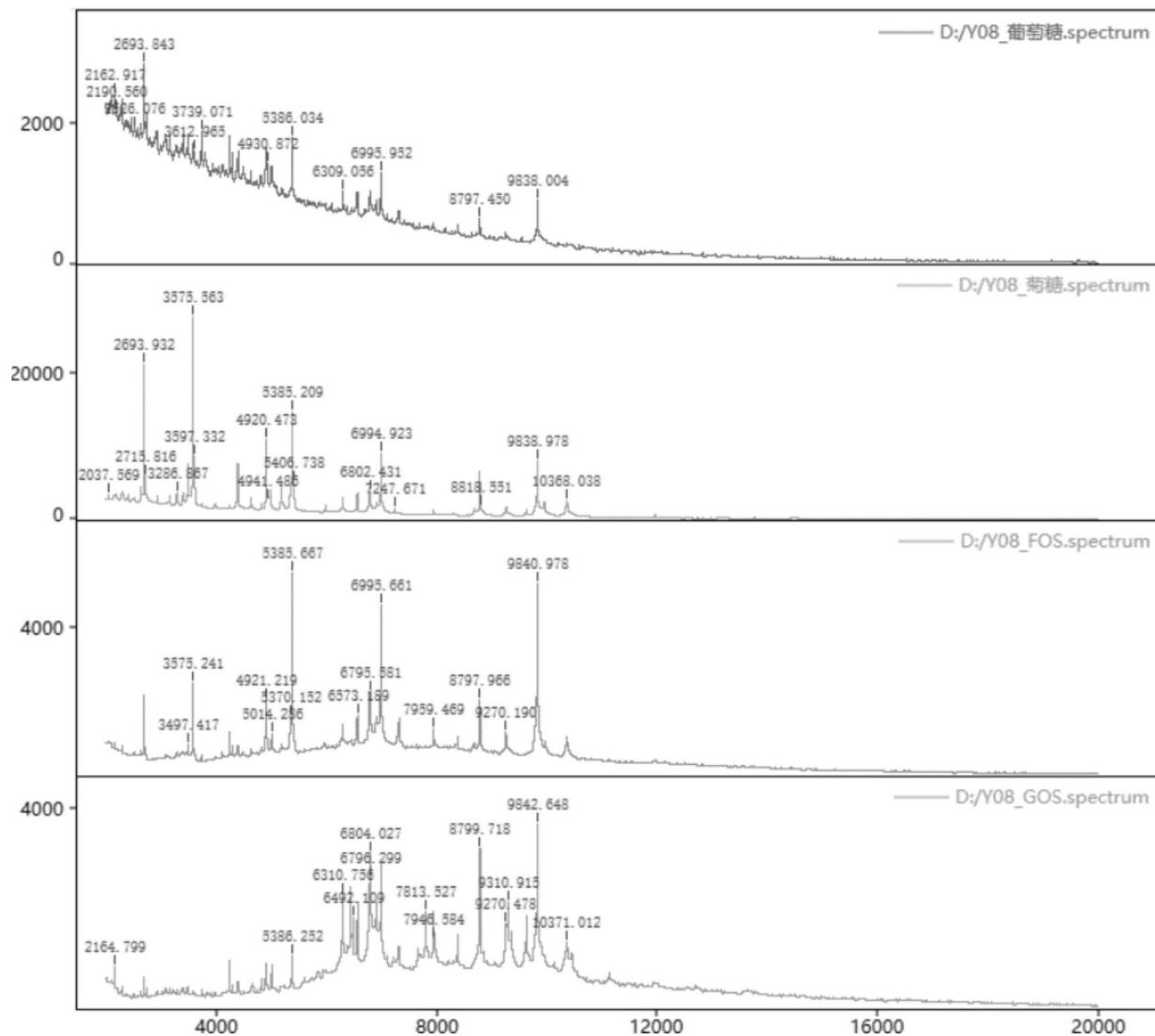


图5

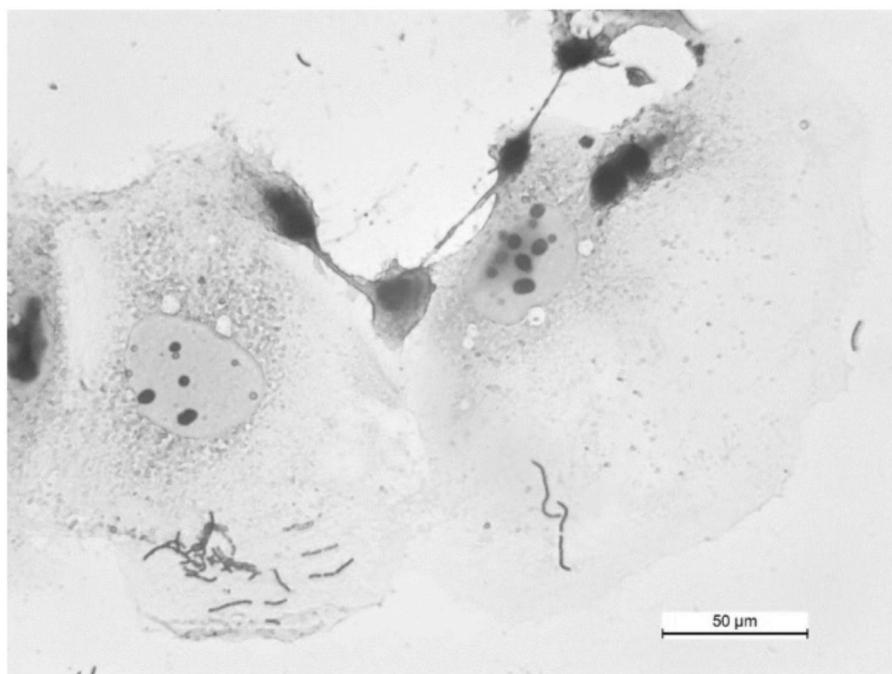


图6