



(21) 申请号 201780050648.1

(22) 申请日 2017.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110121353 A

(43) 申请公布日 2019.08.13

(30) 优先权数据
2016/5454 2016.06.21 BE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/065006 2017.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/220525 EN 2017.12.28

(83) 生物保藏信息
LMG P-29455 2016.03.09
LMG P-29456 2016.03.09
LMG P-29611 2016.05.12

(73) 专利权人 YUN股份有限公司
地址 比利时阿尔策拉尔
专利权人 安特卫普大学

(72) 发明人 S·利比尔 I·卡拉斯
E·欧勒曼斯 M·范登布鲁克

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038
专利代理师 张小勇

(51) Int.Cl.

C12N 1/04 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 8/99 (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20120089530 A, 2012.08.13
CN 103502434 A, 2014.01.08
CN 1984665 A, 2007.06.20
CN 101173228 A, 2008.05.07
CN 1568365 A, 2005.01.19
CN 101163788 A, 2008.04.16
WO 2015140299 A1, 2015.09.24
KR 20150075447 A, 2015.07.06
WO 0113956 A2, 2001.03.01

周敏等. 乳酸杆菌临床应用的研究进展.《中国微生态学杂志》.2009,第21卷(第12期),全文.
Sarah Lebeer等.Selective targeting of skin pathobionts and inflammation with topically applied lactobacilli.《Cell Rep Med》.2022,第3卷(第2期),全文. (续)

审查员 王延羽

权利要求书1页 说明书15页
序列表4页 附图1页

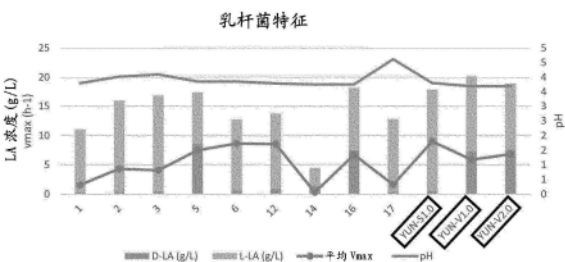
(54) 发明名称

用于维持和/或恢复健康皮肤微生物群的皮肤科制剂

(57) 摘要

本发明涉及有益菌或益生菌在皮肤上的直接应用,以维持健康皮肤微生物群并帮助恢复失衡的皮肤微生物群。本应用是基于使用所选乳杆菌菌株(特别是植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和/或鼠李糖乳杆菌)来作为对抗常见皮肤病原体的抗病原体药剂,由此所产生的酸如乳酸是重要的抗微

生物因子。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Mario Del Piano等.The innovative potential of *Lactobacillus rhamnosus* LR06, *Lactobacillus pentosus* LPS01, *Lactobacillus plantarum* LP01, and

Lactobacillus delbrueckii Subsp. *delbrueckii* LDD01 to restore the "gastric barrier effect" in patients chronically treated with PPI.《J Clin Gastroenterol》.2012,第46卷(第pS18-26期),全文.

1.一种局部皮肤科组合物,其包含多种活乳杆菌种,所述乳杆菌种是植物乳杆菌(*L.plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L.pentosus*)和鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*),其中,所述植物乳杆菌是以保藏编号LMG P-29456保藏的植物乳杆菌YUN-V2.0,所述戊糖乳杆菌是以保藏编号LMG P-29455保藏的戊糖乳杆菌YUN-V1.0,所述鼠李糖乳杆菌是以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0。

2.活乳杆菌种在制备用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群的局部皮肤科组合物中的用途,所述乳杆菌种是植物乳杆菌(*L.plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L.pentosus*)和鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*),其中,所述植物乳杆菌是以保藏编号LMG P-29456保藏的植物乳杆菌YUN-V2.0,所述戊糖乳杆菌是以保藏编号LMG P-29455保藏的戊糖乳杆菌YUN-V1.0,所述鼠李糖乳杆菌是以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0。

3.根据权利要求1所述的局部皮肤科组合物或者根据权利要求2所述的用途,其中,所述组合物是呈凝胶、乳膏、珠剂(ovule)、栓剂形式、泡沫、洗剂或软膏形式的局部皮肤科组合物。

用于维持和/或恢复健康皮肤微生物群的皮肤科制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及有益菌或益生菌在皮肤上的直接局部应用,以维持健康皮肤微生物群(microbiota)并帮助恢复失衡的皮肤微生物群。健康微生物群的恢复被归入术语益生菌治疗(probiotic therapy),其被定义为使用有益微生物或益生菌在发生微生物失调(dysbiosis)的部位恢复健康微生物群。本应用是基于使用所选乳杆菌(*Lactobacillus*)菌株(特别是植物乳杆菌(*L. plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)和/或鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*))来作为对抗常见皮肤病原体的抗病原体药剂,由此产生的酸如乳酸是重要的抗微生物因子。

[0002] 发明背景

[0003] 因此,本发明的目标是为由于皮肤上的异常微生物平衡而患有皮肤病的受试者提供解决方案。此外,已发现植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和/或鼠李糖乳杆菌种在皮肤上的局部使用对于恢复和/或维持健康皮肤微生物群来说非常有效,因此非常适合于缓解有此需要的受试者的皮肤病。

[0004] 包含乳杆菌菌株的口服制剂以前曾用于治疗皮肤病如特应性皮炎。然而,口服给药相对于直接局部给药是不同的给药途径,并且各自具有完全不同的基础机制。在口服给药中,特别期望通过免疫刺激对一般健康产生有益影响,而通过直接皮肤科(皮肤)给药则发生与“不需要的”微生物的竞争。

[0005] 就像胃肠道一样,我们的皮肤蕴藏着独特的微生物生态系统。在皮肤上发现的微生物类型不仅取决于宿主因素、环境因素的组合,还取决于地形位置。这种微生物群在皮肤病中的作用尚未完全阐明。然而,似乎至少一些皮肤病与紊乱的微生物群有关,因为抗微生物治疗能够改善临床症状(Grice&Segre 2011)。例如,在寻常性痤疮中已发现其与痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)的存在相关(Beylot等,2014)。尽管寻常性痤疮是多因素疾病,并且除其他因素外,还受到激素因素的影响,但这些痤疮丙酸杆菌(*P. acnes*)细菌似乎会引起炎症,导致发炎的疙瘩(pimple),也称为丘疹(papule)或脓疱(pustule)。因为还发现健康皮肤上的痤疮丙酸杆菌没有引起粉刺,这表明涉及到了其他因素,使皮肤微生物群的组成的平衡趋向于这种细菌的过度生长。

[0006] 其中微生物群似乎很重要的皮肤病的另一例子是头皮屑(Wang等,2015;Sugita等,2015;Grice&Segre 2011)。在有头皮屑的人中,真菌马拉色菌(*Malassezia*)常常过量出现。有迹象表明,正是这种真菌可能引起该病,这是因为抗真菌治疗改善了症状。相比之下,抗菌疗法并没有改善头皮屑。此外,可以预期这种皮肤病还涉及到其他因素,但与马拉色菌的相关性是令人好奇的。

[0007] 与头皮屑类似,感染有白色念珠菌(*Candida albicans*)或皮肤癣菌如毛癣菌种(*Trichophyton* spp.)的真菌性皮肤感染似乎是与皮肤微生物群中的微生物失调有关的皮肤病,因为这些菌种也出现在健康受试者身上。在足癣(*Tinea pedis*)或“运动员足(athlete's foot)”的病例中,常常观察到红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)或须发毛癣菌(*T. mentagrophytes*)的过度生长。

[0008] 乳酸的产生与可能的其他抗微生物化合物如细菌素结合起来似乎保护免受上述

感染和微生物失调病症,并且乳酸似乎对细菌、真菌甚至病毒病原体都具有活性。正是由于这个原因,乳杆菌被认为在动态皮肤生态系统的稳态方面是重要的。乳杆菌潜在的健康促进机制在于:i)保持健康皮肤pH(+/-5.5),主要通过乳酸的产生;ii)抗微生物化合物的产生和病原体的竞争性排除;iii)调节免疫应答以及iv)强化上皮屏障。

[0009] 因此,本发明的目标是为由于皮肤的异常微生物平衡而患有皮肤病的受试者提供解决方案。此外,已发现植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和/或鼠李糖乳杆菌的局部皮肤使用对于恢复和/或维持皮肤上的健康微生物群非常有效,因此非常适合于缓解有此需要的受试者的皮肤病。

[0010] 包含乳杆菌菌株的口服制剂以前曾用于治疗皮肤病。然而,口服给药相对于直接局部给药是不同的给药途径,并且各自具有完全不同的基础机制。在口服给药中,特别期望通过免疫刺激对一般健康产生有益影响,而通过直接给药到皮肤上则发生与“不需要的”微生物的竞争。

[0011] 发明概述

[0012] 在第一方面,本发明提供了局部皮肤组合物,其包含一种或多种活乳杆菌种;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0013] 在进一步的方面,本发明提供了活乳杆菌种,其用于通过局部途径恢复和/或维持健康皮肤微生物群,所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0014] 在更进一步的方面,本发明提供了一种或多种活乳杆菌种在制备用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群的局部皮肤组合物中的用途;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0015] 本发明还提供了用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群的方法;其包括至少一个通过局部途径向个体施用有效量的一种或多种活乳杆菌种的步骤;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0016] 在另一方面,本发明提供了包含一种或多种活乳杆菌种的组合物,其用于通过局部途径恢复和/或维持健康皮肤微生物群,所述乳杆菌种选自植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和鼠李糖乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株,在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°1至少97%序列相似性的戊糖乳杆菌菌株,以及在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°5至少97%序列相似性的鼠李糖乳杆菌菌株。

[0017] 本发明还提供了乳杆菌菌株,其是以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0(于2016年5月12日保藏于BCCM)。

[0018] 在具体方面,本发明提供了包含一种或多种如本文以上所定义的乳杆菌菌株的组合物。

[0019] 在具体实施方案中,本发明的组合物是局部皮肤组合物,更特别的是以凝胶、乳膏、泡沫、洗剂或者软膏的形式。

[0020] 在另一具体实施方案中,本发明提供了如本文以上所定义的乳杆菌菌株或者如本文以上所定义的组合物;其用于通过局部途径恢复和/或维持健康皮肤微生物群。

[0021] 在具体方面,本发明提供了一种或多种活乳杆菌种在皮肤益生菌治疗中的局部用途;其中所述乳杆菌种选自包含植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的列表;更特别地,所述益生菌治疗由在有此需要的受试者中恢复和/或维持健康皮肤微生物群组成。

[0022] 在另一具体实施方案中,如本文所披露的局部用途、方法和组合物中的所述乳杆菌种是选自包含以下的列表的乳杆菌菌株:以保藏编号LMG P-29456保藏的植物乳杆菌YUN-V2.0(于2016年3月9日保藏于BCCM);以保藏编号LMG P-29455保藏的戊糖乳杆菌YUN-V1.0(于2016年3月9日保藏于BCCM);以及以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0(于2016年5月12日保藏于BCCM)。

[0023] 附图简要说明

[0024] 现在具体参考附图,要强调的是,所示出的细节是通过举例的方式并且仅用于说明性讨论本发明的不同实施方案的目的。提供它们是为了提供被认为是对本发明的原理和概念方面最有用和容易理解的描述。在这方面,没有试图去示出比基本上理解本发明所需的结构细节更详细的本发明的结构细节。就附图所进行的说明是用来指导本领域技术人员在实践中如何可以实施本发明的若干形式。

[0025] 图1:关于乳杆菌在生长、D-和L-乳酸(LA)产生以及降低培养基pH值方面的特征。

[0026] 图2:对乳杆菌耗尽培养上清液抗痤疮丙酸杆菌的抗病原体作用进行分析的时间过程实验。细菌的生长(600nm的光密度;Y轴)相对于时间(X轴)进行测定。每个图表显示了痤疮丙酸杆菌生长的重复实验。能够清楚地注意到,未添加任何抗生素或SCS时,痤疮丙酸杆菌迅速开始生长(NC1)。与添加50μg/ml红霉素类似,所有乳杆菌的SCS都阻止痤疮丙酸杆菌的生长,而链球菌或葡萄球菌的SCS则不抑制生长。^{*}红霉素(50μg/ml);[#]红霉素(5μg/ml);[§]米诺环素(20μg/ml)NC1=培养基对照;NC2=pH4.3的MRS;数字1到22=乳杆菌菌株(详见表1);St=嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*);Ss=唾液链球菌(*Streptococcus salivarius*);Se=表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*);T0.5=0.5%吐温80;T1=1%吐温80。

[0027] 发明详述

[0028] 本发明是基于能够与痤疮丙酸杆菌、白色念珠菌、马拉色菌种(*Malassezia* spp.)、毛癣菌种(*Trichophyton* spp.)以及与诸如寻常性痤疮、头皮屑、足癣或其他真菌皮肤感染之类的皮肤病相关的细菌或真菌进行生长竞争的具体乳杆菌菌株的发现。本文的这些所选菌株通常称为“YUN”菌株,它们能够与皮肤病原体进行竞争,从而恢复健康皮肤微生物群。健康微生物群的恢复被归入术语益生菌治疗,其被定义为使用有益微生物或益生菌在发生微生物失调的部位恢复健康微生物群。

[0029] 因此,在第一方面,本发明提供了局部皮肤组合物,其包含一种或多种活乳杆菌种;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0030] 根据本发明的所述组合物可以包含例如选自包含戊糖乳杆菌、格氏乳杆菌(*L. gasseri*)、卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、詹氏乳杆菌(*L. jensenii*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)、鼠李糖乳杆菌的非限制性列表的另外的乳杆菌

种。

[0031] 在本发明的上下文中,术语“局部”意指在身体的具体位置处的局部递送,特别是应用于身体上的具体位置。特别地,它包括通过非固体制剂的应用,例如乳膏、泡沫、凝胶、洗剂或软膏。术语“局部”并不打算包括诸如胶囊、片剂等固体制剂形式的递送。

[0032] 因此,术语“局部皮肤”的意思是包括使用非固体制剂直接局部递送到身体皮肤上。优选地,将根据本发明的组合物涂敷大面积皮肤以便最有效。

[0033] 在本发明的上下文中,术语“活乳杆菌种”是指存活的乳杆菌种,不是指其碎片、培养上清液或被杀死的形式。

[0034] 在进一步的方面,本发明提供了通过局部途径用于皮肤益生菌治疗的活乳杆菌种,所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。如本文以上已定义的,所述益生菌治疗是指在有此需要的受试者中恢复和/或维持健康皮肤微生物群。

[0035] 可受益于这种益生菌治疗的受试者是例如患有与皮肤微生物群紊乱相关的皮肤病的人(people/persons),可能是由于细菌或酵母感染和/或由特定致病微生物的过度生长所引起的任何微生物失调,这些皮肤病如寻常性痤疮、足癣、头皮屑、蔷薇样病(rosaceae)、脓疱病等。

[0036] 因此,在进一步的方面,本发明提供了一种或多种活乳杆菌种在制备用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群的局部皮肤组合物中的用途;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0037] 本发明也提供了用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群的方法;其包括至少一个通过局部途径向个体施用有效量的一种或多种活乳杆菌种的步骤;其中至少一种所述乳杆菌种是植物乳杆菌;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株。

[0038] 在另一方面,本发明提供了包含一种或多种活乳杆菌种的组合物,其用于通过局部途径恢复和/或维持健康皮肤微生物群,所述乳杆菌种选自包含植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的列表;更特别的是在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°4至少97%序列相似性的植物乳杆菌菌株;在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°1至少97%序列相似性的戊糖乳杆菌菌株以及在其16S rRNA基因中具有与SEQ ID N°5至少97%序列相似性的鼠李糖乳杆菌菌株。

[0039] 本发明还提供了乳杆菌菌株,其选自包含以下的列表:以保藏编号LMG P-29455保藏的戊糖乳杆菌YUN-V1.0(于2016年3月9日保藏于BCCM);以保藏编号LMG P-29456保藏的植物乳杆菌YUN-V2.0(于2016年3月9日保藏于BCCM);以及以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0(于2016年5月12日保藏于BCCM)。

[0040] 本文所提到的微生物保藏是已经保藏在BCCM/LMG菌种保藏中心(“比利时微生物协调保藏中心”)的,通讯地址:Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, K.L.Ledeganckstraat 35-9000 Gent, Belgium

[0041] 戊糖乳杆菌YUN-V1.0是本实验室继代培养最初为健康妇女阴道分离株的菌株后所获得的单菌落分离株。使用引物8F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'-SEQ ID N°2)和1525R

(5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' -SEQ ID N°3) 经PCR来确认戊糖乳杆菌菌株YUN-V1.0的16S rRNA基因序列(SEQ ID N°1)。

[0042] YUN-V2.0和YUN-V3.0是本实验室继代培养最初分别分离自人唾液和玉米青贮的植物乳杆菌菌株后所获得的单菌落分离株。使用引物8F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' -SEQ ID N°2) 和1525R (5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' -SEQ ID N°3) 经PCR来确认植物乳杆菌菌株YUN-V2.0的16S rRNA基因序列(SEQ ID N°4)。

[0043] YUN-S1.0是本实验室继代培养最初分离自健康人的鼠李糖乳杆菌菌株后所获得的单菌落分离株。使用引物8F (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' -SEQ ID N°2) 和1525R (5' -AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' -SEQ ID N°3) 经PCR来确认鼠李糖乳杆菌菌株YUN-S1.0的16S rRNA基因序列(SEQ ID N°5)。

[0044] 这些具体“YUN”菌株能够以本身使用,或者优选地配制成包含这些菌株的组合物。所述组合物是局部皮肤组合物,更特别的是以诸如乳膏、泡沫、凝胶、洗剂或软膏之类的非固体制剂形式。

[0045] 特别地,本发明提供了用于皮肤益生菌治疗的以上所定义的“YUN”菌株,即用于恢复和/或维持健康皮肤微生物群。

[0046] 在更进一步的方面,本发明提供了一种或多种活乳杆菌种在皮肤益生菌治疗中的局部用途;其中所述乳杆菌种选自包含植物乳杆菌、戊糖乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的列表;更特别地,所述益生菌治疗由在有此需要的受试者中恢复和/或维持健康皮肤微生物群组成。

[0047] 在具体实施方案中,如本文所公开的局部用途、方法和组合物中的乳杆菌种是选自包含以下的列表的乳杆菌菌株:以保藏编号LMG P-29456保藏的植物乳杆菌YUN-V2.0 (于2016年3月9日保藏于BCCM);以保藏编号LMG P-29455保藏的戊糖乳杆菌YUN-V1.0 (于2016年3月9日保藏于BCCM);以及以保藏编号LMG P-29611保藏的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0 (于2016年5月12日保藏于BCCM)。

实施例

[0048] 材料和方法

[0049] 细菌菌株和培养条件

[0050] 于37°C在de Man,Rogosa and Sharpe (MRS) 培养基 (Carl Roth) 中培养乳杆菌菌株(表1)。所有细菌均在不振荡条件下培养,并从甘油原种(-80°C)接种。固体培养基包含1.5% (w/v) 的琼脂。

[0051] 表1:本研究中所使用的细菌菌株

[0052]

菌种	#	菌株	相关基因型或描述	参考文献和/或来源
乳杆菌				
干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus casei</i>)	1	ATCC334	本实验室从 ATCC334 原种培养物获得的单菌落分离株	ATCC
干酪乳杆菌	2	DN-114001	本实验室从包含干酪乳杆菌 DN-114001 的市售发酵饮料 (Actimel®) 获得的单菌落分离株, 经测序确认	市售益生菌产品
干酪乳杆菌	3	Shirota	本实验室从包含干酪乳杆菌 Shirota (Yakult®) 的市售发酵饮料获得的单菌落分离株, 经测序确认	市售益生菌产品
戊糖乳杆菌	4	YUN-V1.0	单菌落分离株	
植物乳杆菌	5	LMG1284	来自植物乳杆菌 ATCC8014 或 LMG1284 的单菌落分离株	ATCC
罗伊氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus reuteri</i>)	6	RC-14	本实验室从包含罗伊氏乳杆菌 RC-14 的市售益生菌补充剂获得的单菌落分离株, 经测序确认	市售益生菌产品
鼠李糖乳杆菌	7	YUN-S1.0	临床分离株	
鼠李糖乳杆菌	12	GR-1	本实验室从包含鼠李糖乳杆菌 GR-1 的市售益生菌补充剂获得的单菌落分离株	(Chan 等, 1984; 1985; Reid 1999; Reid & Bruce 2001), ATCC
瑞士乳杆菌 (<i>Lactobacillus helveticus</i>)	14	AMB-2	单菌落分离株	市售益生菌产品
植物乳杆菌	15	YUN-V2.0	单菌落分离株	
植物乳杆菌	16	5057	单菌落分离株	
副干酪乳杆菌 (<i>Lactobacillus paracasei</i>)	17	LMG12586	本实验室从 LMG12586 原种培养物获得的单菌落分离株	BCCM/LMG
植物乳杆菌	22	/	单菌落分离株	
戊糖乳杆菌	25	LMG8041	单菌落分离株	BCCM/LMG
病原体				
红色毛癣菌 (<i>Trichophyton rubrum</i>)	2	/	临床分离株	BCCM/LMG
糠秕马拉色菌 (<i>Malassezia furfur</i>)		/	临床分离株	BCCM/LMG
白色念珠菌	/	/	临床分离株	

[0053] 所选菌株的耗尽培养上清液 (SCS) 制备

[0054] 为了获得包含所分泌的活性抗菌产物的耗尽培养上清液 (SCS), 从预培养物中接种各菌种特异性的生长培养基, 培养24小时。通过在4℃以6797g (8000rpm) 离心30分钟来获得SCS。然后将SCS过滤灭菌 (0.20μm醋酸纤维素, VWR)。

[0055] 抗糠秕马拉色菌、红色毛癣菌、痤疮丙酸杆菌和白色念珠菌的活乳杆菌共培养的抗微生物活性测定。

[0056] 通过稍加修改的标准抗微生物试验, 研究了所选细菌的抗微生物活性。通过斑点测定法 (Schillinger and Lücke 1989) 研究了所选细菌的抗微生物活性。简而言之, 将1-3 μL的每种培养物点在琼脂平板上。根据菌株的不同, 将这些平板培养24小时至72小时。接下来, 将病原体的过夜培养物稀释成7mL的病原体培养基软琼脂, 并倒入到带有所选菌株斑点

的平板上。在30-37℃将平板过夜培养,然后测定抑制区。在倒入软琼脂之前,将咪康唑(用于真菌)和/或0.1%海克替啶(hexetidine)和/或四环素(用于痤疮丙酸杆菌)的斑点添加到斑点平板上作为阳性对照。

[0057] 乳杆菌SCS的辐射扩散试验(radial diffusion test)

[0058] 此外,使用如以前所描述的用于乳杆菌与胃肠道病原体之间竞争测定法的操作方案(Coconnier等,1997),研究了耗尽培养上清液(SCS)的抗微生物活性。使用咪康唑(用于真菌)和四环素(用于痤疮丙酸杆菌)作为阳性对照。使用无菌生长培养基作为阴性对照。

[0059] 所选菌株的SCS抗念珠菌、痤疮丙酸杆菌、糠秕马拉色菌和毛癣菌种(还称为“病原体”)的抗微生物活性的时间过程分析。

[0060] 与以前所描述的(De Keersmaecker等,2006)类似,稍加修改来进行时间过程分析。简而言之,将病原体的过夜培养物添加到填充了50-80%适当培养基的微孔板的孔中,所述培养基补充有50-5%的乳杆菌SCS。使用pH 4.3的MRS和适当浓度的抗生素或抗真菌剂分别用作阴性和阳性对照。培养细菌或真菌,使用Synergy HTX多模式分析仪(Biotek)在3天内每30分钟测定590nm的光密度(OD)。每个试验至少重复测定三次,并计算平均OD。将抗微生物活性表达为24小时后(静止期)所达到的与阴性对照相比的相对光密度。

[0061] 抗生素敏感性

[0062] 使用Kirby-Bauer纸片扩散试验评价抗生素敏感性。简而言之,将抗生素点在纸片上,并测定琼脂平板上的细菌抑制区。所测试的抗生素为相关浓度的红霉素、normocin、四环素、氨苄青霉素和克林霉素。

[0063] 寻常性痤疮患者的概念验证性人体临床试验

[0064] 对20例寻常性痤疮患者进行了概念验证性临床试验。患者为12-25岁之间的男性,患有轻度炎性痤疮。本概念验证试验的目的是评估局部益生菌乳膏(每次涂敷的1g局部乳膏ACN包含 $\pm 10^{-8}$ 菌落形成单位(CFU)的戊糖乳杆菌YUN-V1.0、 $\pm 10^{-8}$ CFU的植物乳杆菌YUN-V2.0以及 $\pm 10^{-8}$ CFU的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0)对皮肤微生物群和痤疮严重程度的影响。要求患者连续56天(8周)每天两次涂敷该乳膏。皮肤科医生在开始时(治疗前)、第4周、第8周和第10周看了患者。每次就诊都取样了皮肤拭子。通过市售MoBio Powersoil试剂盒从这些样品分离了细菌DNA(参考人类微生物组计划)。通过用MiSeq Illumina对16S rRNA扩增子测序来分析所分离的DNA,并进行生物信息学分析。此外,进行了临床评分,并在每次就诊时拍照。

[0065] 足癣(运动员足)患者的概念验证性人体临床试验

[0066] 对20例足癣患者进行了概念验证性临床试验。患者为18-65岁之间,患有足癣。本概念验证试验的目的是评估局部益生菌乳膏(每次涂敷的1g局部乳膏FNG包含 $\pm 10^{-8}$ 菌落形成单位(CFU)的戊糖乳杆菌YUN-V1.0、 $\pm 10^{-8}$ CFU的植物乳杆菌YUN-V2.0以及 $\pm 10^{-8}$ CFU的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0)对皮肤微生物群和毛癣菌感染的影响。要求患者连续56天(8周)每天两次涂敷该乳膏。皮肤科医生在开始时(治疗前)、第4周、第8周和第10周看了患者。每次就诊都取样了皮肤拭子。通过市售MoBio Powersoil试剂盒从这些样品分离了细菌DNA(参考人类微生物组计划)。通过用MiSeq Illumina对16S rRNA扩增子测序来分析所分离的DNA,并进行生物信息学分析。为分析真菌的存在,还将拭子在毛癣菌特异性培养基(由BCCM建议的培养基)上铺开(plate out)。使用通用ITS(转录间隔区)引物ITS1(SEQ ID N°6)

(5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和ITS4 (SEQ ID N°7) (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行菌落PCR并随后测序来鉴别真菌。此外,进行了临床评分,并在每次就诊时拍照。

[0067] 结果

[0068] 生长特征和乳酸产生

[0069] 表征了可能的有益菌株或益生菌株的生长特征、乳酸产生和降低培养基pH的能力。预期这些特征对其抗病原体活性是重要的。这些数据表明,戊糖乳杆菌YUN-V1.0和植物乳杆菌YUN-V2.0和鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0产生最高量的乳酸(图1)。

[0070] 抗痤疮丙酸杆菌的抗病原体活性

[0071] 进行了时间过程实验来分析所选菌株的耗尽培养上清液(SCS)抗痤疮丙酸杆菌的抗菌活性。所测试的所有菌株的SCS均抑制痤疮丙酸杆菌的生长,而如嗜热链球菌和唾液链球菌以及乳酸菌和表皮葡萄球菌之类的其他细菌菌种的SCS则均不抑制痤疮丙酸杆菌的生长。这表明所选乳杆菌的菌种特异性以及可能是菌株特异性的性质对于抗痤疮丙酸杆菌的抗病原体活性很重要(图2)。

[0072] 抗马拉色菌、毛癣菌和念珠菌的抗病原体活性

[0073] 在下一阶段,筛选了有益菌或益生菌对具体皮肤病病原体的抗病原体作用。抗糠秕马拉色菌、红色毛癣菌和白色念珠菌的斑点测定结果分别示于表1、2和3中。

[0074] 表1:所选乳杆菌抗糠秕马拉色菌的斑点测定

菌株	糠秕马拉色菌		
	实验 1	实验 2	实验 3
1	++	-	+
2	++	-	+
3	+	+	-
4	++	+++	++
5	+++	++	++
6	+	++	++
7	++	-	-
12	+	-	-
13	+	-	+
14	-	+	-
15	+++	+++	+++
16	++	++	++
17	-	+	-
22	+++	++	++
25	++	++	+

[0076] *显示了三次独立重复

[0077] 表2:所选乳杆菌抗红色毛癣菌的斑点测定

[0078]

菌株	红色毛癣菌		
	实验 1	实验 2	实验 3
1	+	++	+++
2	+	++	++
3	+	++	++
4	++	++	+++
5	++	++	+++
6	-	-	+++
7	++	+++	+
12	++	+++	+++
13	++	-	-
14	+	++	++
15	+++	+++	+++
16	++	+++	+++
17	+	+++	++
22	++	+++	+++
25	++	+++	+++

[0079] *显示了三次独立重复

[0080] 表3:所选乳杆菌抗白色念珠菌的辐射扩散试验

[0081]

菌株	白色念珠菌		
	实验 1	实验 2	实验 3
1	-	-	-
2	+	+	+
3	+	+	+
4	++	++	++
5	+	+	+
6	-	-	-
7	+	+	++
12	+	+	+
13	/	/	/
14	+	-	-
15	+	+	++
16	+	+	+
17	-	-	-
22	/	/	/
25	/	/	/

[0082] *显示了三次独立重复

[0083] 在辐射扩散试验中还测试了戊糖乳杆菌YUN-V1.0和植物乳杆菌YUN-V2.0的耗尽培养上清液,证实其有效抑制马拉色菌、毛癣菌和念珠菌生长。鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0在抑制马拉色菌的生长方面不是那么有效,但能够抑制毛癣菌和念珠菌的生长。

[0084] 抗生素敏感性

[0085] 还测试了所选细菌的抗生素敏感性,以防止抗生素耐药基因的传播。除植物乳杆

菌5057对四环素敏感外,所有乳杆菌均对红霉素、normocin、四环素、氨苄青霉素和克林霉素敏感。由于这一原因,发现植物乳杆菌5057菌株不适合作为益生菌治疗菌株使用。

[0086] 参考文献

[0087] Beylot,C.et al.,2014.Propionibacterium acnes:an update on its role in the pathogenesis of acne.Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology□:JEADV,28(3),pp.271-8.

[0088] Chan,R.C.et al.,1985.Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by Lactobacillus whole cells and cell wall fragments.Infection and immunity,47(1),pp.84-9.

[0089] Chan,R.C.,Bruce,A.W.&Reid,G.,1984.Adherence of cervical,vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion.The Journal of urology,131(3),pp.596-601.

[0090] Grice,E.A.&Segre,J.A.,2011.The skin microbiome.Nature reviews.Microbiology,9(4),pp.244-53.

[0091] Reid,G.,1999.The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus.Appl.Envir.Microbiol.,65(9),pp.3763-3766.

[0092] Reid,G.&Bruce,A.W.,2001.Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications.The Journal of infectious diseases,183 Suppl,pp.S77-80.

[0093] Sugita,T.et al.,2015.Temporal changes in the skin Malassezia microbiota of members of the Japanese Antarctic Research Expedition(JARE):A case study in Antarctica as a pseudo-space environment.Medical mycology,53(7),pp.717-24.

[0094] Wang,L.et al.,2015.Characterization of the major bacterial-fungal populations colonizing dandruff scalps in Shanghai,China,shows microbial disequilibrium.Experimental dermatology,24(5),pp.398-400.

序列表

<110> YUN NV

<120> 用于维持和/或恢复健康皮肤微生物群的皮肤科制剂

<130> YUN-002

<150> BE2016/5454

<151> 2016-06-21

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1406

<212> RNA

<213> 戊糖乳杆菌

<223> 16S rRNA 序列

<400> 1

cttaggcggc tggttcctaa aagggtaccc caccgacttt ggggtgttaca aactctcatg 60
gtgtgacggg cgggtgtgtac aaggcccggg aacgtattca ccgcggcatg ctgatccgcg 120
attactagcg attccgactt catgtaggcg agttgcagcc tacaatccga actgagaatg 180
gctttaagag attagcttac tctcgcgagt tcgcaactcg ttgtaccatc cattgtagca 240
cgtgtgtagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg tcatcccccac cttcctccgg 300
tttgtcaccg gcagttctcac cagagtgccc aacttaatgc tggcaactga taataagggg 360
tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac aaccatgcac 420
cacctgtatc catgtccccg aagggaacgt ctaatctctt agatttgcat agtatgtcaa 480
gacctggtaa ggttcttcgc gtagcttcga attaaaccac atgctccacc gcttgtgcgg 540
gccccgtca attcctttga gtttcagcct tgcggccgta ctcccaggc ggaatgctta 600
atgcgttagc tgcagcactg aagggcggaa accctccaac acttagcatt catcgtttac 660
ggatatggact accaggggat ctaatcctgt ttgctaccca tactttcgag cctcagcgtc 720
agttacagac cagacagccg ccttcgccac tgggtgttctt ccataatatc acgcatttca 780
ccgctacaca tggagttcca ctgtcctctt ctgcactcaa gtttcccagt ttccgatgca 840
cttcttcggg tgagccgaag gctttcacat cagacttaaa aaaccgcctg cgctcgcttt 900
acgccaata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta 960
gttagccgtg gctttctggt taaataccgt caatacctga acagttactc tcagatatgt 1020
tcttctttaa caacagagtt ttacgagccg aaacccttct tcaactcacgc ggcgttgctc 1080
catcagactt tcgtocattg tggaagattc cctactgctg cctcccgtag gagtttgggc 1140
cgtgtctcag tcccaatgtg gccgattacc ctctcaggtc ggctacgtat cattgccatg 1200
gtgagccgtt accccaccat ctagctaata cgccgcggga ccatccagaa gtgatagccg 1260
aagccatctt tcaaactcgg accatgcggg ccaagttggt atgcgggtatt agcatctggt 1320
tccaggtggt atcccccgct tctgggcagg ttcccacgt gttactcacc agttcgccac 1380
tcactcaaat gtaaatacatg atgcaa 1406

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 引物 8F

<400> 2

agagtttgat cctggctcag

20

[0095]

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <223> 引物 1525R
 <400> 3
 aaggaggtga tccagccgca

20

<210> 4
 <211> 1425
 <212> RNA
 <213> 植物乳杆菌
 <223> 16S rRNA
 <400> 4

[0096]

ggttcctaaa aggtttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacgggc 60
 ggtgtgtaca agggcccgga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgcga ttactagcga 120
 ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg ctttaagaga 180
 ttagcttact ctgcgaggtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac gtgtgtagcc 240
 caggtcataa ggggcatgat gattttgacgt catccccacc ttcttcgggt ttgtcacccg 300
 cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt gcgctcgttg 360
 cgggacttaa cccaacatct cagcacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtatcc 420
 atgtccccga agggaacgct taatctctta gatttgcata gtatgtcaag acctggtaag 480
 gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg cccccgtcaa 540
 ttcttttgag tttcagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa tgcgttagct 600
 gcagcactga agggcgga aa cctccaaca cttagcattc atcgtttacg gtatggacta 660
 ccagggtatc taatcctggt tgctacccat actttcgagc ctcagcgtca gttacagacc 720
 agacagccgc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac cgctacacat 780
 ggagttccac tgtcctcttc tgcaactcaag tttcccagtt tccgatgcac ttcttcgggt 840
 gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgttta cgcccaataa 900
 atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggctgc tggcacgtag ttagccgtgg 960
 cttctctggt aaataaccgt aataacctgaa cagttactct cagatatggt cttctttaac 1020
 aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt 1080
 cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt 1140
 cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggctc gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 1200
 ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt 1260
 caagctcgga ccagtcggtc caagttgtta tgcggtatta gcactctgtt ccaggtgtta 1320
 tcccccgctt ctgggcaggt tttccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaagt 1380
 taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcgtt cgact 1425

<210> 5
 <211> 1403
 <212> RNA
 <213> 鼠李糖乳杆菌
 <223> 16S rRNA
 <400> 5

	gtcgacgagt tctgattatt gaaagggtgct tgcattcttga tttaattttg aacgagtggc	60
	ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc ccttaagtgg gggataacat ttggaaacag	120
	atgctaatac cgcataaatc caagaaccgc atgggttcttg gctgaaagat ggcgtaagct	180
	atcgcttttg gatggaccgc cggcgattta gctagttagt gaggtaacgg ctcaccaagg	240
	caatgatacg tagccgaact gagagggtga tcggccacat tgggactgag acacggccca	300
	aactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca	360
	acgccgcgtg agtgaagaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttggttga gaagaatgg	420
	cggcagagta actgttgctg gcgtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
	gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcggttatcc ggattttattg ggcgtaaagc	540
	gagcgcaggc ggttttttaa gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgc	600
	cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcgggtgaaa	660
	tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggtctg taactgacgc	720
	tgaggctcga aagcatgggt agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa	780
	cgatgaatgc taggtgttgg agggtttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc	840
	attccgcctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgc	900
	caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
	atcttttgat cactgagag atcagggttc cccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca	1020
	tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct	1080
	tatgactagt tgccagcatt tagttgggca ctctagtaag actgccggtg acaaaccgga	1140
	ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg cccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
	caatggatgg tacaacgagt tgcgagaccg cgagggtcaag ctaatctctt aaagccattc	1260
[0097]	tcagttcgga ctgtagctg caactgcct acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg	1320
	atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgc gccttgata caccgcccgt cacaccatga	1380
	gagtttgtaa caccgaagc cgg	1403

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 引物序列

<400> 6

tccgtaggtg aacctgcgg

19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<223> 引物序列

<400> 7

tcctccgctt attgatatgc

20

PCT

打印出来（原件以电子形式）

（本页不是国际申请的一部分并且不作为国际申请的页面计算）

[0098]

0-1	PCT/RO/134 表 与保藏的微生物或其他生物材料有关的说明（PCT 细则 13bis）	
0-1-1	使用.....填写	PCT Online Filing 版本: 3.5.00251e MT/FOP 20141031/0.20.5.20
0-2	国际申请号	EP2017054513
0-3	申请人或代理人的卷号	YUN-002
1	下面的说明涉及在说明书的第几页第几行中提到的保藏微生物或其他生物材料:	
1-1	页	4
1-2	行	15
1-3	保藏标识	
1-3-1	保藏机构名称	BCCM 比利时微生物协调保藏中心 (BCCM)
1-3-2	保藏机构地址	BCCM Coordination Cell, Federal Public Planning Service Science Policy, 231, avenue Louise, 1050 Brussels, Belgium
1-3-3	保藏日期	2016 年 5 月 12 日 (2016.05.12)
1-3-41	保藏号	BCCM LMG P-29611
1-4	其他说明	鼠李糖乳杆菌 YUN-S1.0
1-5	本说明的指定国	所有指定国
2	下面的说明涉及在说明书的第几页第几行中提到的保藏微生物或其他生物材料:	
2-1	页	4
2-2	行	13
2-3	保藏标识	
2-3-1	保藏机构名称	BCCM 比利时微生物协调保藏中心 (BCCM)
2-3-2	保藏机构地址	BCCM Coordination Cell, Federal Public Planning Service Science Policy, 231, avenue Louise, 1050 Brussels, Belgium
2-3-3	保藏日期	2016 年 3 月 9 日 (2016.03.09)
2-3-41	保藏号	BCCM LMG P-29456
2-4	其他说明	植物乳杆菌 YUN-V2.0
2-5	本说明的指定国	所有指定国

PCT

打印出来（原件以电子形式）

（本页不是国际申请的一部分并且不作为国际申请的页面计算）

[0099]

3	下面的说明涉及在说明书的第几页第几行中提到的保藏微生物或其他生物材料：	
3-1	页	4
3-2	行	14
3-3	保藏标识	
3-3-1	保藏机构名称	BCCM 比利时微生物协调保藏中心 (BCCM)
3-3-2	保藏机构地址	BCCM Coordination Cell, Federal Public Planning Service Science Policy, 231, avenue Louise, 1050 Brussels, Belgium
3-3-3	保藏日期	2016 年 3 月 9 日 (2016.03.09)
3-3-41	保藏号	BCCM LMG P-29455
3-4	其他说明	戊糖乳杆菌 YUN-V1.0
3-5	本说明的指定国	所有指定国
		仅用于受理局
0-4	该表格与国际申请一起收到： （是或者否）	是
0-4-1	授权官员	Wilson, Patrick
		仅用于国际局
0-5	该表格由国际局收到的日期：	
0-5-1	授权官员	

- [0001] 序列表
- [0002] <110> YUN NV
- [0003] <120> 用于维持和/或恢复健康皮肤微生物群的皮肤科制剂
- [0004] <130> YUN-002
- [0005] <150> BE2016/5454
- [0006] <151> 2016-06-21
- [0007] <160> 7
- [0008] <170> BiSSAP 1.3.6
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 1406
- [0011] <212> RNA
- [0012] <213> 戊糖乳杆菌
- [0013] <220>
- [0014] <223> 16S rRNA序列
- [0015] <400> 1
- [0016] cttaggcggc tggttcctaa aagggttacc caccgacttt ggggtgttaca aactctcatg 60
- [0017] gtgtgacggg cgggtgtgtac aaggcccggg aacgtattca ccgcggcatg ctgatccgcg 120
- [0018] attactagcg attccgactt catgtaggcg agttgcagcc tacaatccga actgagaatg 180
- [0019] gctttaagag attagcttac tctcgcgagt tcgcaactcg ttgtaccatc cattgttagca 240
- [0020] cgtgtgttagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg tcatccccac ctctctccgg 300
- [0021] tttgtcaccg gcagtctcac cagagtcccc aacttaatgc tggcaactga taataagggt 360
- [0022] tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac aaccatgcac 420
- [0023] cacctgtatc catgtccccg aagggaacgt ctaatctctt agatttgcat agtatgtcaa 480
- [0024] gacctggtaa ggttcttcgc gtagcttcga attaaaccac atgctccacc gcttgtgcgg 540
- [0025] gcccccgta attcctttga gtttcagcct tgcgggcgta ctccccaggc ggaatgctta 600
- [0026] atgcgttagc tgcagcactg aaggcgga accctccaac acttagcatt categtttac 660
- [0027] ggtatggact accagggtat ctaatcctgt ttgctaccca tactttcgag cctcagcgtc 720
- [0028] agttacagac cagacagccg ctttcgccac tgggtgttctt ccatatatct acgcatttca 780
- [0029] ccgtacaca tggagttcca ctgtctctt ctgcactcaa gtttcccagt ttccgatgca 840
- [0030] cttcttcggt tgagccgaag gctttcacat cagacttaaa aaaccgcctg cgtcgtcttt 900
- [0031] acgccaata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta 960
- [0032] gttagccgtg gctttctggt taaataccgt caatacctga acagttactc tcagatatgt 1020
- [0033] tcttctttaa caacagagtt ttacgagccg aaacccttct tcaactcacgc ggcgttgctc 1080
- [0034] catcagactt tcgtccattg tggaagattc cctactgctg cctcccgtag gagtttgggc 1140
- [0035] cgtgtctcag tcccaatgtg gccgattacc ctctcaggtc ggctacgtat cattgccatg 1200
- [0036] gtgagccggt accccaccat ctagctaata cgccgcggga ccatccagaa gtgatagccg 1260
- [0037] aagccatctt tcaaactcgg accatgcggt ccaagttgtt atgcggtatt agcatctgtt 1320
- [0038] tccaggtgtt atccccgct tctgggcagg tttcccacgt gttactcacc agttcggcac 1380
- [0039] tcaactcaa gtaaatcatg atgcaa 1406
- [0040] <210> 2
- [0041] <211> 20

[0042]	<212> DNA	
[0043]	<213> 人工序列	
[0044]	<220>	
[0045]	<223> 引物8F	
[0046]	<400> 2	
[0047]	agagtttgat cctggctcag	20
[0048]	<210> 3	
[0049]	<211> 20	
[0050]	<212> DNA	
[0051]	<213> 人工序列	
[0052]	<220>	
[0053]	<223> 引物1525R	
[0054]	<400> 3	
[0055]	aaggaggtga tccagccgca	20
[0056]	<210> 4	
[0057]	<211> 1425	
[0058]	<212> RNA	
[0059]	<213> 植物乳杆菌	
[0060]	<220>	
[0061]	<223> 16S rRNA	
[0062]	<400> 4	
[0063]	ggttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacgggc	60
[0064]	ggtgtgtaca aggcccgga acgtattcac cgcgcatgc tgatccgcga ttactagcga	120
[0065]	ttccgacttc atgtaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg ctttaagaga	180
[0066]	ttagcttact ctgcgagtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgtagcac gtgtgtagcc	240
[0067]	caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttctccggt ttgtcaccgg	300
[0068]	cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt gcgctcgttg	360
[0069]	cgggacttaa cccaacatct cagcacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtatcc	420
[0070]	atgtccccga agggaaacgtc taatctctta gatttgcata gtatgtcaag acctggtaag	480
[0071]	gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg cccccgtcaa	540
[0072]	ttcctttgag ttccagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa tgcgttagct	600
[0073]	gcagcactga agggcgga aa cctccaaca cttagcattc atcgtttacg gtatggacta	660
[0074]	ccagggtatc taatcctggt tgctaccat actttcgagc ctcagcgtca gttacagacc	720
[0075]	agacagccgc cttcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac cgctacacat	780
[0076]	ggagttccac tgcctcttc tgcactcaag tttccagtt tccgatgcac ttcttcggtt	840
[0077]	gagccgaagg ctttcacatc agacttaaaa aaccgcctgc gctcgcttta cgcccaataa	900
[0078]	atccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggtgc tggcacgtag ttagccgtgg	960
[0079]	ctttctgggt aaataaccgtc aataactgaa cagttactct cagatatggt cttctttaac	1020
[0080]	aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgctcc atcagacttt	1080
[0081]	cgtccattgt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttgggcc gtgtctcagt	1140
[0082]	cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta	1200
[0083]	ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatcttt	1260

[0084]	caagctcggg ccatgcggtc caagttgtta tgcggtatta gcatctgttt ccaggtgtta	1320
[0085]	tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtg ttactcacca gttcgccact cactcaaatg	1380
[0086]	taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcggt cgact	1425
[0087]	<210> 5	
[0088]	<211> 1403	
[0089]	<212> RNA	
[0090]	<213> 鼠李糖乳杆菌	
[0091]	<220>	
[0092]	<223> 16S rRNA	
[0093]	<400> 5	
[0094]	gtcgacgagt tctgattatt gaaaggtgct tgcattctga ttttaattttg aacgagtggc	60
[0095]	ggacgggtga gtaacacgtg ggtaacctgc ccttaagtgg gggataacat ttggaaacag	120
[0096]	atgctaatac cgcataaatc caagaaccgc atggttcttg gctgaaagat ggcgtaagct	180
[0097]	atcgcttttg gatggaccgc cggcggtatta gctagttggt gaggtaacgg ctcaccaagg	240
[0098]	caatgatacg tagccgaact gagaggttga tgcgccacat tgggactgag acacggccca	300
[0099]	aactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca	360
[0100]	acgccgcgtg agtgaagaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttggttga gaagaatggt	420
[0101]	cggcagagta actgttgtcg gcgtgacggt atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
[0102]	gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttatcc ggatttattg ggcgtaaagc	540
[0103]	gagcgcaggc ggttttttaa gtctgatgtg aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgc	600
[0104]	cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa	660
[0105]	tgcgtagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggtctg taactgacgc	720
[0106]	tgaggctcga aagcatgggt agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa	780
[0107]	cgatgaatgc taggtgttgg agggtttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc	840
[0108]	attccgcctg gggagtacga ccgcaaggtt gaaactcaaa ggaattgacg ggggccccga	900
[0109]	caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
[0110]	atcttttgat cacctgagag atcaggtttc cccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca	1020
[0111]	tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct	1080
[0112]	tatgactagt tgccagcatt tagttgggca ctctagtaag actgccggtg acaaacggga	1140
[0113]	ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
[0114]	caatggatgg tacaacgagt tgcgagaccg cgaggtcaag ctaatctctt aaagccattc	1260
[0115]	tcagttcgga ctgtaggctg caactgcct acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg	1320
[0116]	atcagcacgc cgcggtgaat acgttcccgc gccttgatga caccgcccgt cacaccatga	1380
[0117]	gagtttgtaa caccgaagc cgg	1403
[0118]	<210> 6	
[0119]	<211> 19	
[0120]	<212> DNA	
[0121]	<213> 人工序列	
[0122]	<220>	
[0123]	<223> 引物序列	
[0124]	<400> 6	
[0125]	tccgtaggtg aacctgcgg	19

[0126]	<210> 7
[0127]	<211> 20
[0128]	<212> DNA
[0129]	<213> 人工序列
[0130]	<220>
[0131]	<223> 引物序列
[0132]	<400> 7
[0133]	tcctccgctt attgatatgc 20

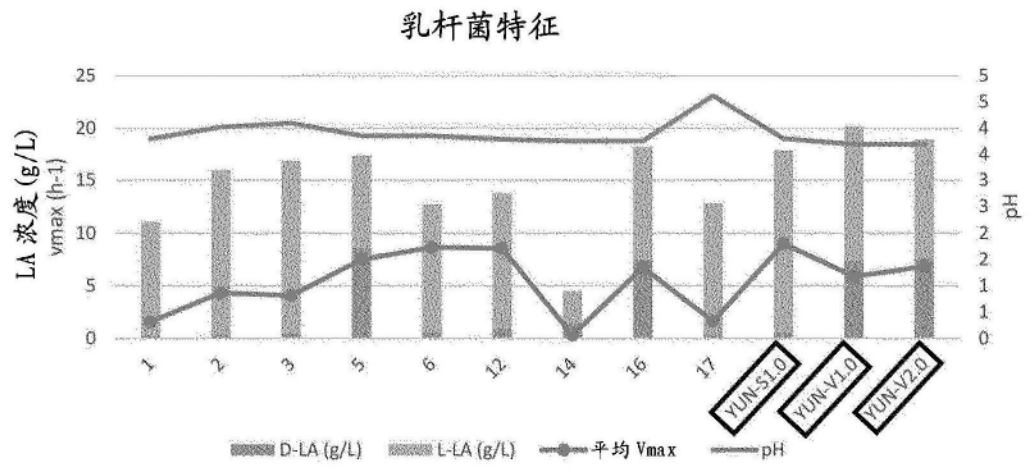


图1

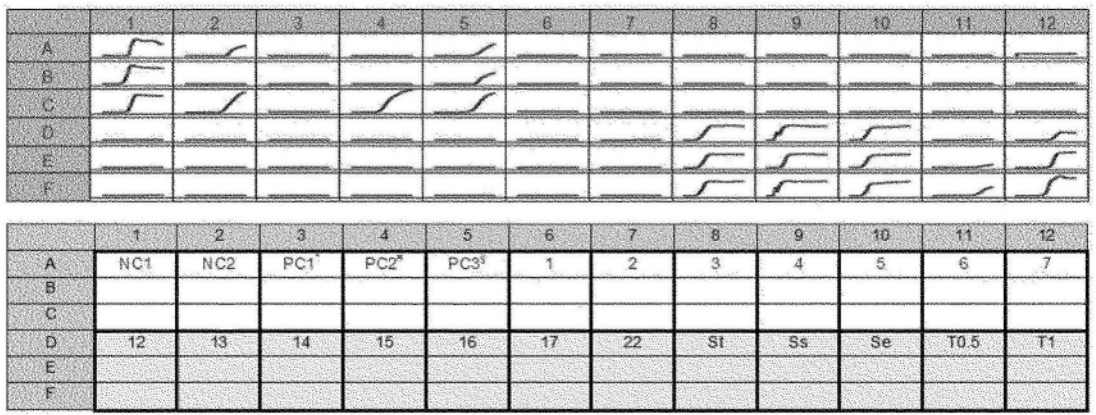


图2