



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110121353 B

(45) 授权公告日 2024.03.12

(21) 申请号 201780050648.1

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2017.06.20

C12N 1/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 35/747 (2015.01)

申请公布号 CN 110121353 A

A61P 17/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.08.13

A61K 8/99 (2017.01)

(30) 优先权数据

A61Q 19/00 (2006.01)

2016/5454 2016.06.21 BE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2019.02.19

KR 20120089530 A, 2012.08.13

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 103502434 A, 2014.01.08

PCT/EP2017/065006 2017.06.20

CN 1984665 A, 2007.06.20

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101173228 A, 2008.05.07

W02017/220525 EN 2017.12.28

CN 1568365 A, 2005.01.19

(83) 生物保藏信息

CN 101163788 A, 2008.04.16

LMG P-29455 2016.03.09

WO 2015140299 A1, 2015.09.24

LMG P-29456 2016.03.09

KR 20150075447 A, 2015.07.06

LMG P-29611 2016.05.12

WO 0113956 A2, 2001.03.01

(73) 专利权人 YUN股份有限公司

周敏等.乳酸杆菌临床应用的研究进展.《中

地址 比利时阿尔策拉尔

国微生物学杂志》.2009,第21卷(第12期),全文.

专利权人 安特卫普大学

Sarah Lebeer等.Selective targeting of

skin pathogens and inflammation with
topically applied lactobacilli.《Cell Rep
Med》.2022,第3卷(第2期),全文. (续)

(72) 发明人 S·利比尔 I·卡拉斯

审查员 王延羽

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

权利要求书1页 说明书15页

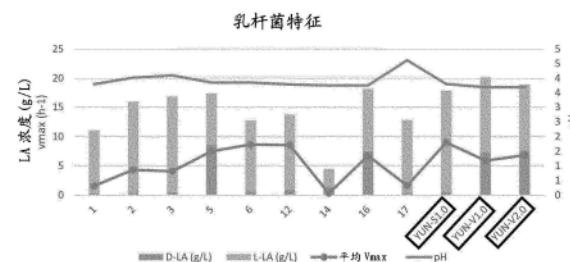
有限公司 11038

序列表4页 附图1页

专利代理人 张小勇

(54) 发明名称

生物因子。

用于维持和/或恢复健康皮肤微生物群的皮
肤科制剂

B 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

CN 110121353

[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(*probiotherapy*),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(pustel)。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,抗细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50 μ g/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(50 μ g/ml);[#]红霉素(5 μ g/ml);^{\$}米诺环素(20 μ g/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' -AGAGTTGATCCTGGCTCAG-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' -AGAGTTGATCCTGGCTCAG-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

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	

[0052] 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°C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、糠秕马拉色菌和毛囊菌种(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+-10⁻⁸菌落形成单位(CFU)的戊糖乳杆菌YUN-V1.0、+-10⁻⁸ CFU的植物乳杆菌YUN-V2.0以及+-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] 足藓(运动员足)患者的概念验证性人体临床试验

[0066] 对20例足藓患者进行了概念验证性临床试验。患者为18-65岁之间,患有足藓。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+-10⁻⁸菌落形成单位(CFU)的戊糖乳杆菌YUN-V1.0、+10⁻⁸ CFU的植物乳杆菌YUN-V2.0以及+-10⁻⁸ CFU的鼠李糖乳杆菌YUN-S1.0)对皮肤微生物群和毛囊菌感染的影响。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,还将拭子在毛囊菌特异性培养基(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' -TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-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、毛薛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原体的抗病原体作用。抗糠秕马拉色菌、红色毛薛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	++	++	+

[0075] [0076] *显示了三次独立重复

[0077] 表2:所选乳杆菌抗红色毛薛菌的斑点测定

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

[0078] [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

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	/	/	/

[0081] [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 tggttccctaa aagggtaccc caccgactt ggggtttaca aactctcatg 60
 gtgtgacggg cggtgtgtac aaggccccgg aacgtattca ccgcggcatg ctgatcccg 120
 attactagcg attccgactt catgtaggcg agtgtcagcc tacaatccga actgagaatg 180
 gcttaaagag attagcttac tctcgcgagt tcgcaactcg ttgttaccatc cattgttagca 240
 cgtgtgttagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacy tcatccccac cttcctccgg 300
 tttgtcaccg gcagtctcac cagagtgcac aacttaatgc tggcaactga taataagggt 360
 tgcgctcggt gcccggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac aaccatgcac 420
 cacctgtatc catgtccccg aagggaacgt ctaatctt agatttgcatt agtatgtcaa 480
 gacctggtaa ggttcttcgc gtagcttcga attaaaccac atgctccacc gcttgtgcgg 540
 gccccgtca attcccttga gtttccgcct tgccggccgtt ctcccccaggc ggaatgctta 600
 atgcgttagc tgcagcactg aaggccggaa accctccaac acttagcatt catcgttac 660
 ggtatggact accagggtat ctaatccgt ttgttaccca tactttcgcag cctcagcgtc 720
 agttacagac cagacagccg cttccgccac tgggtttctt ccataatatct acgcatttca 780
 ccgctacaca tggagttcca ctgtcccttt ctgcactcaa gtttcccagt ttccgatgca 840
 ctcttcgggt tgagccgaag gcttccatc cagacttaaa aaaccgcctg cgctcgctt 900
 acgcccata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgta 960
 gttagccgtg gctttctggtaaaataaccgt caatacctga acagttactc tcagatatgt 1020
 tcttccttaa caacagagtt ttacgagccg aaacccttct tcactcacgc ggcgttgctc 1080
 catcagactt tcgtccatgt tggaagattc cctactgctg cctcccgtag gagtttggc 1140
 cgtgtctcag tcccaatgtg gccgattacc ctctcaggc ggctacgtat cattgccatg 1200
 gtgagccgtt accccaccat ctagctaata cgcgcgggaa ccattccagaa gtgatagccg 1260
 aagccatctt tcaaactcgg accatgcgtt ccaagttgtt atgcgttatt agcatctgtt 1320
 tccaggtgtt atcccccgct tctggcagg ttcccacgt gttactcacc agttcggccac 1380
 tcactcaaataat gtaaatcatg atgcaa 1406

[0095] <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <223> 引物 8F
 <400> 2
 agagtttgcatg cctggctcag 20

<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
ggttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacgggc 60
ggtgtgtaca aggccccggga acgtattcac cgccggcatgc tgatccgcga ttactagcga 120
ttccgacttc atgttaggcga gttcagccct acaaattcgaa ctgagaatgg cttaagaga 180
tttagcttact ctcgcgagtt cgcaactcgt tgtaccatcc attgttagcac gtgtgttagcc 240
caggtcataa ggggcattat gatttgcgt catccccacc ttccctccgggt ttgtcaccgg 300
cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt gcgcgcgttg 360
cgggacttaa cccaaacatct cacgacacga gctgacgaca accatgcacc acctgtatcc 420
atgtccccga agggAACGTC taatcttta gatttgcata gtatgtcaag acctggtaag 480
[0096] gttcttcgcg tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg ccccccgtcaa 540
ttcctttgag tttcagccctt gcccgcgtac tcccccaggcg gaatgcttaa tgcgttagct 600
gcagcactga agggcggaaa ccctccaaca cttagcatc atcgtttacg gtatggacta 660
ccagggtatc taatcctgtt tgctacccat actttcgagc ctcagcgtca gttacagacc 720
agacagccgc ctgcgcact ggtgttctt catatatcta cgcathttac cgctacacat 780
ggagttccac tgcactcaag tttccagtt tccgatgcac ttcttcgggt 840
gagccgaagg ctttcacatc agactaaaa aaccgcctgc gtcgcgttta cgcccaataa 900
atccggacaa cgcttgcac ctacgttta ccgcggctgc tggcacgtag ttagccgtgg 960
ctttctgggt aaataccgtc aatactgaa cagttactct cagatatgtt cttctttaac 1020
aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgcg gcgttgcctt atcagacttt 1080
cgccattgtt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtttggcc gtgtctcagt 1140
cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggctcg gtcacgtatc attgccatgg tgagccgtta 1200
ccccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatctt 1260
caagctcggc ccatgcggc caagttgtt tgcgttta gcatctgtt ccaggtgtta 1320
tcccccgctt ctgggcaggt ttcccacgtt ttactcacca gttcgccact cactcaaatg 1380
taaatcatga tgcaagcacc aatcaatacc agagttcggtt cgact 1425

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

	gtcgacgagt tctgatttattt gaaagggtgt tgcatcttga tttaattttg aacgagtgcc	60
	ggacgggtga gtaaacacgtg ggttaacctgc ccttaagtgg gggataacat ttggaaacag	120
	atgctaatac cgcataaaatc caagaaccgc atggctctg gctgaaagat ggcgtaagct	180
	atcgcttttgc gatggaccccg cggcgtatttta gctagtttgtt gaggttaacgg ctcaccaagg	240
	caatgataacg tagccgaact gagagggttga tcggccacat tgggactgag acacggccca	300
	aactcctacg ggaggcagca gtagggaaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca	360
	acgccgcgtg agtgaagaag gctttcgggt cgtaaaaactc tggttggta gaagaatgg	420
	cggcagagta actgttgcg gcgtgacggat atccaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
	gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttatcc ggatttatttgg ggcgtaaagc	540
	gagcgcagggc ggtttttaa gtctgtatgtt aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgcatt	600
	cggaaactgg gaaacttgag tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa	660
	tgcgttagata tatggaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggctcg taactgacgc	720
	tgaggctcga aagcatgggt agcgaacacagg attagatacc ctggtagtcc atgcgtaaa	780
	cgtatgaatgc taggtgttgg agggttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc	840
	attccgcctg gggagtaacga ccgcaagggtt gaaactcaaa ggaattgacg gggccccgca	900
	caagcgggtgg agcatgtgggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
	atctttgtat cacctgagag atcagggttc cccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca	1020
	tgttgtcgat cagctcgatgtt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga ggcgaaccct	1080
	tatgactagt tgccagcatt tagttggca ctctagtaag actgccggtg acaaaccgg	1140
	ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
	caatggatgg tacaacaggt tgcgagaccg cgaggtcaag ctaatctttt aaagccattc	1260
[0097]	tcagttcgga ctgttaggctg caactcgctt acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgccg	1320
	atcagcacgc cgccgtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccggccgt cacaccatga	1380
	gagtttgtaa caccgaaacgc cggtt	1403

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 引物序列
<400> 6
tccgttaggtg aacctgcggg 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)

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)

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	
[0099]	3-3-1	保藏机构名称
	3-3-2	BCCM 比利时微生物协调保藏中心 (BCCM) 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	
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 aagggttaccc caccgacttt gggtgttaca aactctcatg 60
[0017] gtgtgacggg cggtgtgtac aaggcccggg aacgtattca ccgcggcatg ctgatcccg 120
[0018] attactagcg attccgactt catgtaggcg agttgcagcc tacaatccga actgagaatg 180
[0019] gcttaagag attagttac tctcgcgagt tcgcaactcg ttgtaccatc cattgttagca 240
[0020] cgtgtgttagc ccaggtcata aggggcatga tgatttgacg tcatccccac cttcctccgg 300
[0021] tttgtcaccg gcagtctcac cagagtgccc aacttaatgc tggcaactga taataagggt 360
[0022] tgcgctcggt gcgggactta acccaacatc tcacgacacg agctgacgac aaccatgcac 420
[0023] cacctgtatc catgtcccg aagggAACgt ctaatcttt agatttgcatt agtatgtcaa 480
[0024] gacctggtaa ggttcttcgc gtagcttcga attaaaccac atgctccacc gcttgcgg 540
[0025] gccccgtca attccttga gttcagccct tgcggccgt a ccccgaggc ggaatgctta 600
[0026] atgcgttagc tgcagactg aaggcgaa accctccaa accttgcattt catcggttac 660
[0027] ggtatggact accagggtat ctaatcctgt ttgctaccca tacttcgag cctcagcg 720
[0028] agttacagac cagacagccg cttcgccac tgggtttctt ccatatatct acgcattca 780
[0029] ccgctacaca tggagttcca ctgtcctt ctgcactcaa gtttccagt ttccgatgca 840
[0030] cttcttcgggt tgagccgaag gcttcacat cagactaaa aaaccgcctg cgctcgctt 900
[0031] acgcccata aatccggaca acgcttgcca cctacgtatt accgcggctg ctggcacgt 960
[0032] gttagccgtg gctttctggtaaaataccgt caatacctga acagttactc tcagatatgt 1020
[0033] tcttcttaa caacagagtt ttacgagccg aaacccttct tcactcacgc ggcgttgctc 1080
[0034] catcagactt tcgtccattt gggaaaggattc cctactgctg cctcccgtag gagttggc 1140
[0035] cgtgtctcag tcccaatgtg gccgattacc ctctcaggc ggctacgtat cattgccatg 1200
[0036] gtgagccgtt accccaccat ctagctaata cggccggaa ccatccagaa gtgatagccg 1260
[0037] aagccatctt tcaaactcg accatgcggt ccaagttgtt atgcggattt agcatctgtt 1320
[0038] tccaggtgtt atcccccgct tctggcagg tttccacgt gttactcacc agttcgccac 1380
[0039] tcactcaa at 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] agagtttgcat 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] aaggagggtga 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] gtttcctaaa aggttacccc accgactttg ggtgttacaa actctcatgg tgtgacggc 60
[0064] ggtgtgtaca aggccccggga acgtattcac cgccggcatgc tgatccgcga ttactagcga 120
[0065] ttccgacttc atgttaggcga gttgcagcct acaatccgaa ctgagaatgg cttaagaga 180
[0066] tttagcttact ctcgcgagtt cgcaactcggt tgcattaccatttttagcac gtgtgttagcc 240
[0067] caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttccctccgggt ttgtcaccgg 300
[0068] cagtctcacc agagtgccca acttaatgct ggcaactgat aataagggtt ggcgcgttt 360
[0069] cgggacttaa cccaaacatct cacgacacga gctgacgaca accatgcacc acctgttatcc 420
[0070] atgtccccga agggAACGTC taatcttta gatttgacata gtatgtcaag acctggtaag 480
[0071] gttcttcgca tagcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg ctttgtcggg ccccccgtcaa 540
[0072] ttcccttgag ttccagcctt gcggccgtac tccccaggcg gaatgcttaa tgcgttagct 600
[0073] gcagcactga agggcggaaa ccctccaaca ctttagcatc atcggttacg gtatggacta 660
[0074] ccagggtatc taatcctgtt tgctacccat actttcgagc ctcagcgtca gttacagacc 720
[0075] agacagccgc ctgcgccact ggtgttcttc catatatcta cgcatttcac cgctacacat 780
[0076] ggagttccac tgctcttcc tgctactcaag ttcccagggtt tccgatgcac ttcttcgggt 840
[0077] gagccgaagg ctccacatc agactaaaa aaccgcctgc gctcgctta cgcccaataa 900
[0078] atccggacaa cgcttgcac ctacgttta ccggcggctgc tggcacgttag tttagccgtgg 960
[0079] ctctctgggtt aaataccgtc aataacctgaa cagttactct cagatatgtt ctctttaac 1020
[0080] aacagagttt tacgagccga aacccttctt cactcacgca gcgttgctcc atcagacttt 1080
[0081] cgtccattgtt ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agttgggcc gtgtctcagt 1140
[0082] cccaatgtgg ccgattaccc tctcaggtcg gctacgtatc attgccatgg tgagccgtta 1200
[0083] cccaccatc tagctaatac gccgcgggac catccaaaag tgatagccga agccatctt 1260

[0084] caagctcgga ccatgcggc caagttgtta tgcggattt gcatctgtt ccaggtgtt 1320
[0085] tcccccgctt ctgggcagg ttcacgtt tactcacca gttgccact 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 tctgatttattt gaaagggtgt tgcattttttt aacgagtggc 60
[0095] ggacgggtga gtaaacacgtg ggtaacctgc ccttaagtgg gggataacat ttggaaacag 120
[0096] atgctaatac cgcataaaatc caagaaccgc atggttctt gctgaaagat ggcgtaaatg 180
[0097] atcgctttt gatggaccgg cggcgtttaa gctagttggt gaggttaacgg ctcaccaagg 240
[0098] caatgatacg tagccgaact gagaggttga tcggccacat tggacttag acacggccc 300
[0099] aactcctacg ggaggcagca gttaggaaatc ttccacaatg gacgcaagtc tgatggagca 360
[0100] acgcccgtg agtgaagaag gcttcgggt cgtaaaactc tgggttgaa gaagaatgg 420
[0101] cggcagagta actgttgtcg gcgtgacggt atccaaccag aaaggcacgg ctaactacgt 480
[0102] gccagcagcc gcggtaatac gtaggtggca agcgttatcc ggatttattt ggcgtaaagc 540
[0103] gagcgcaggc ggtttttaa gtctgatgtt aaagccctcg gcttaaccga ggaagtgcac 600
[0104] cgaaaactgg gaaacttgat tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtaaaa 660
[0105] tgcgtatata tatggaaagaa caccagtggc gaaggcggct gtctggctg taactgacgc 720
[0106] tgaggctcga aagcatgggt agcgaacagg attagatacc ctggtagtcc atgcgttaaa 780
[0107] cgatgaatgc taggtgttgg agggttccg cccttcagtg ccgcagctaa cgcattaagc 840
[0108] attccgcctg gggagttacga ccgcagggtt gaaactcaaa ggaatttgcg gggcccgca 900
[0109] caagcggtgg agcatgtgtt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaacccttacc aggtcttgcac 960
[0110] atcttttgcacat cacctgagat atcaggtttc cccttcgggg gcaaaatgac aggtggtgca 1020
[0111] tggttgtcgt cagctcggt cgtgagatgt tgggttaatg cccgcaacga ggcgtttttt 1080
[0112] tatgacttagt tgccagcatt tagttggca ctctagtaag actgccgggt acaaaccgg 1140
[0113] ggaagggtgg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctggctac acacgtgcta 1200
[0114] caatggatgg tacaacgagt tgcgagaccg cgaggtaag ctaatctttt aaaggccattc 1260
[0115] tcagttcgga ctgttaggctg caactcgcctt acacgaagtc ggaatcgcta gtaatcgccg 1320
[0116] atcagcacgc cgccgtaat acgttccgg gccttgcata caccggccgt cacaccatga 1380
[0117] gagtttgtaa cacccgaagc cggtt 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] tccgttaggtg 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

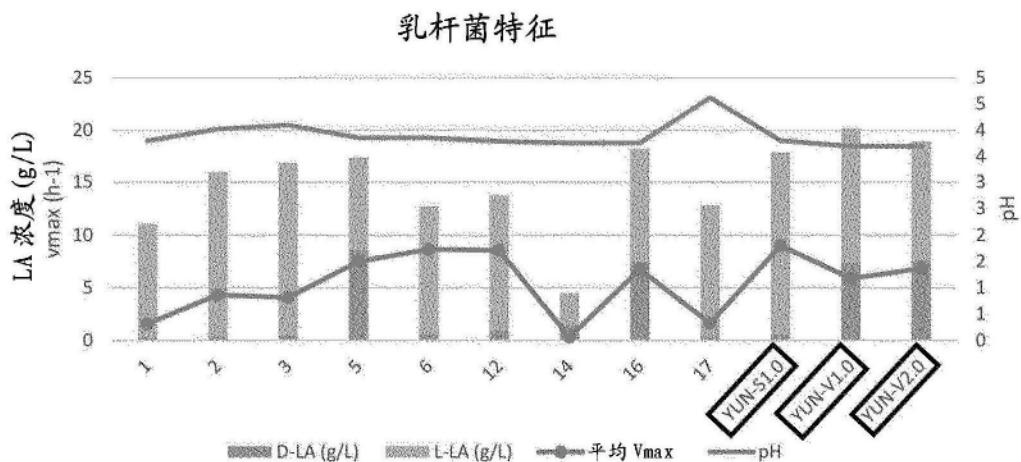


图1

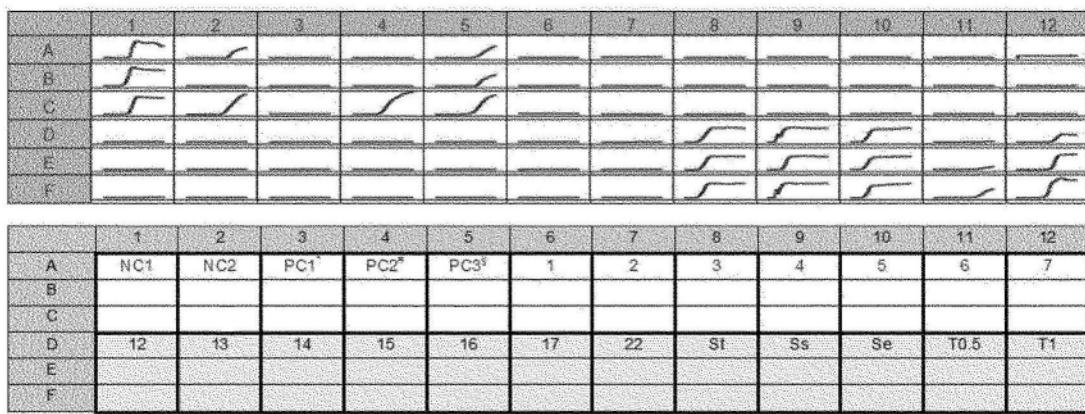


图2