



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110652528 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201910914490.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.06.03

A61K 35/742(2015.01)

(30)优先权数据

A61K 35/74(2015.01)

2010-129134 2010.06.04 JP

A61K 39/08(2006.01)

PCT/JP2010/071746 2010.12.03 JP

A61K 39/02(2006.01)

A61P 31/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61P 37/00(2006.01)

201180037900.8 2011.06.03

C12Q 1/02(2006.01)

(71)申请人 国立大学法人东京大学

C12Q 1/04(2006.01)

地址 日本东京

C12R 1/145(2006.01)

(72)发明人 本田贤也 新幸二 伊藤喜久治

田上大

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

权利要求书3页 说明书33页

序列表42页 附图31页

(54)发明名称

诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物

(57)摘要

本发明涉及诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物。本发明人发现属于梭菌属的细菌在结肠中诱导调节性T细胞(Treg细胞)的积累。此外,本发明人发现由这些细菌诱导的调节性T细胞(Treg细胞)阻遏效应T细胞的增殖。根据这些发现,本发明人发现利用属于梭菌属的细菌或由其获得的生理活性物质使得可能诱导调节性T细胞(Treg细胞)的增殖或积累,并进一步阻遏免疫功能。

1. 诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物,所述组合物包含选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质作为活性成分:

- (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;
- (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和
- (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述调节性T细胞是转录因子Foxp3阳性的调节性T细胞或产生IL-10的调节性T细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述组合物具有免疫阻遏效应。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

5. 在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向所述个体施用选自由以下(a)~(c)组成的组的至少一种物质的步骤:

- (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;
- (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和
- (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

6. 在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向所述个体施用针对革兰氏阴性细菌的抗生素的步骤。

7. 在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向所述个体施用选自由以下组成的组的至少一种物质的步骤:扁桃仁皮、菊糖、低聚果糖、棉子糖、乳果糖、果胶、半纤维素、支链淀粉、乙酰辅酶A、生物素、甜菜糖蜜、酵母提取物和抗性淀粉。

8. 根据权利要求5~7中任一项所述的方法,其中还向所述个体施用治疗组合物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述治疗组合物是选自由以下组成的组的至少一种组合物:皮质类固醇、美沙拉嗪、氨水杨酸、柳氮磺吡啶、柳氮磺吡啶衍生物、免疫阻遏药物、环孢菌素A、硫嘌呤、硫唑嘌呤、泼尼松、甲氨蝶呤、抗组胺剂、糖皮质激素、肾上腺素、茶碱、色甘酸钠、抗白三烯剂、抗胆碱能鼻炎药物、抗胆碱能减充血剂、肥大细胞稳定剂、单克隆抗-IgE抗体、疫苗和其组合。

10. 根据权利要求5~9中任一项所述的方法,其中选自由IL-10表达的增加、CTLA4表达的增加、IDO表达的增加和IL-4表达的阻遏组成的组的一种测量用作所述个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的指标。

11. 在个体中抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向所述个体施用针对革兰氏阳性细菌的抗生素的步骤。

12. 根据权利要求5~11中任一项所述的组合物,其中所述调节性T细胞是转录因子Foxp3阳性的调节性T细胞或产生IL-10的调节性T细胞。

13. 疫苗组合物,包含选自由以下(a)~(c)组成的组的至少一种物质:

- (a) 属于梭菌属的细菌;
- (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分中的细菌孢子;和
- (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分中的细菌。

14. 在个体中治疗、辅助治疗、降低其严重度或预防选自传染性疾病和自身免疫性疾病的至少一种疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用根据权利要求13所述的疫苗组合物。

15. 筛选具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括:

(1) 由选自以下(a)~(c)组成的组的至少一种物质准备测试物质:

(a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

(b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

(c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

(2) 准备其中在IL-10基因表达控制下表达报告基因的非人哺乳动物;

(3) 使所述测试物质与所述非人哺乳动物接触;

(4) 在与述测试物质接触后,检测所述非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞,和确定所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;

(5) 检测未与所述测试物质接触的非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞,和确定所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;和

(6) 将(4)中确定的所述数目或所述比例与(5)中确定的所述数目或所述比例进行比较,和当(4)中确定的所述数目或所述比例大于(5)中确定的所述数目或所述比例时,确定所述测试物质是促进Treg细胞的增殖或积累的化合物。

16. 非人哺乳动物,用于根据权利要求15所述的方法,且其中所述报告基因在IL-10基因表达的控制下表达。

17. 从属于梭菌属的细菌样品中分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括(1)~(3):

(1) 从所述属于梭菌属的细菌样品制备基因组DNA;

(2) 将所述基因组DNA插入克隆系统,和制备来自所述属于梭菌属的细菌样品的基因文库;和

(3) 通过利用步骤(2)中获得的所述基因文库分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物。

18. 治疗方法,包括(1)~(3):

(1) 测量受试者的微生物群中梭菌IV簇和XIV簇的百分比和/或绝对量,,

(2) 将它们与健康个体中的相同测量值进行比较;和

(3) 如果与所述健康个体相比检测到所述受试者中梭菌IV簇、XIV簇的数目/量的统计学显著的降低,则向所述受试者施用一种物质,其中所述物质是选自以下(a)~(c)组成的组的至少一种物质:

(a) 根据权利要求1~4中任一项所述的物质,

(b) 针对革兰氏阴性细菌的抗生素;和

(c) 根据权利要求7所述的物质。

19. 监测方法,其包括(1)~(2):

(1) 施用选自以下(a)~(c)组成的组的至少一种物质后,测量受试者中梭菌IV簇、XIV簇的水平:

- (a) 根据权利要求1~4中任一项所述的组合物,
 - (b) 针对革兰氏阴性细菌的抗生素,和
 - (c) 根据权利要求7所述的物质;和
- (2) 如果所述水平增加,则判断为所述受试者有利地响应的体征。

诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物

[0001] 本申请是2011年6月3日提交的同名发明专利申请201180037900.8的分案申请。

[技术领域]

[0002] 本发明涉及具有诱导调节性T细胞的增殖或积累效应的组合物,且该组合物包含属于梭菌(*Clostridium*)属的细菌、由所述细菌获得的生理活性物质、细菌孢子等作为活性成分。本发明还涉及诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,以及抑制这种增殖或积累的方法。此外,本发明涉及含有至少一种属于梭菌属的细菌菌株或细菌孢子的疫苗组合物,以及通过向有相应需要的个体施用所述疫苗组合物来治疗或预防选自传染性疾病和自身免疫性疾病的至少一种疾病或病症的方法。本发明还涉及筛选促进调节性T细胞的增殖或积累的化合物的方法,以及该方法中使用的非人哺乳动物,且其中报告基因在IL-10基因表达的控制下表达。

[背景技术]

[0003] 数百种共生微生物物种居住在哺乳动物的胃肠道内,并与宿主免疫系统密切相互作用。使用无菌(GF)动物的研究表明,共生微生物对粘膜免疫系统的形成发挥很大影响,粘膜免疫系统的形成诸如派尔集合淋巴结(peyer's patch)(PP)和单独的淋巴滤泡(ILF)的组织发生、抗微生物肽从上皮的分泌和粘膜组织中独特淋巴细胞的积累,独特淋巴细胞包括产生免疫球蛋白A的浆细胞、上皮内淋巴细胞、产生IL-17的CD4阳性T细胞(Th 17)和产生IL-22的NK样细胞(非专利文献1至7)。因此,肠道细菌的存在增强了粘膜的保护功能,为宿主提供了抵抗侵入机体的病原微生物的强大免疫反应。另一方面,粘膜免疫系统维持了对膳食抗原和无害微生物的无反应性(非专利文献3)。因此,共生细菌和免疫系统之间交叉效应(cross-talk)的调节异常(肠道生态失调)可能导致针对环境抗原的过度强大的免疫反应,从而引起炎症肠病(IBD)(非专利文献8至10)。

[0004] 最近的研究结果表明单独共生细菌控制粘膜免疫系统中其特异性免疫细胞的分化。例如,脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*),其是人类的共生细菌,在小鼠中特异性诱导系统性Th1细胞应答和粘膜性产生IL-10的T细胞应答,并在保护宿主不患结肠炎方面起作用,而结肠炎另外由病原体引起(非专利文献3)。分节丝状菌,其是小鼠的肠道共生细菌,被表明诱导粘膜Th17细胞应答并由此增强针对宿主胃肠道的病原体感染的抗性(非专利文献11至13)。另外,已知由几种共生细菌获得的短链脂肪酸阻遏肠道炎症(非专利文献14)。此外,推测一些物种的肠道微生物群的存在对调节性T细胞(下文称为“Treg细胞”)的分化发挥很大影响,这维持了免疫系统的稳态。

[0005] 同时,已被鉴定为阻遏免疫性的亚群的调节性T细胞是其中表达转录因子Foxp3的CD4⁺ T细胞,并已知其在维持免疫稳态中起重要作用(非专利文献8、9、15和16)。此外,已知表达Foxp3的细胞尤其是在结肠中大量存在,而仅有在结肠中局部存在的Treg细胞恒定地以高水平表达IL-10,IL-10是免疫阻遏性细胞因子(非专利文献17)。还已知具有从中特异地除去IL-10的CD4⁺ Foxp3⁺细胞的动物发展炎症肠病(非专利文献18)。

[0006] 因此,如果阐明了在结肠中以高水平产生IL-10的Treg细胞的诱导机制,就可以增强免疫阻遏,这进而可用于治疗自身免疫性疾病诸如炎症肠病,以及用于器官移植。

[0007] 然而,还不清楚大量Treg细胞如何变得存在于结肠中和Treg细胞如何在结肠中以高水平产生IL-10的机制。此外,哪些构成肠道共生细菌菌丛的细菌物种对调节性T细胞的诱导发挥影响也仍然是不清楚的。

[0008] [引用列表]

[0009] [非专利文献]

[0010] [NPL 1] J.J.Cebra, "Am J Clin Nutr", May, 1999, 69, 1046S

[0011] [NPL 2] A.J.Macpherson, N.L.Harris, "Nat Rev Immunol", June 2004, 4, 478

[0012] [NPL 3] J.L.Round, S.K.Mazmanian, "Nat Rev Immunol", May 2009, 9, 313

[0013] [NPL 4] D.Bouskra等, "Nature", November 27, 2008, 456, 507

[0014] [NPL 5] K.Atarashi等, "Nature", October 9, 2008, 455, 808

[0015] [NPL 6] Ivanov, II等, "Cell Host Microbe", October 16, 2008, 4, 337

[0016] [NPL 7] S.L.Sanos等, "Nat Immunol", January 2009, 10, 83

[0017] [NPL 8] M.A.Curotto de Lafaille, J.J.Lafaille, "Immunity", May 2009, 30, 626

[0018] [NPL 9] M.J.Barnes, F.Powrie, "Immunity", September 18, 2009, 31, 401

[0019] [NPL 10] W.S.Garrett等, "Cell", October 5, 2007, 131, 33

[0020] [NPL 11] Ivanov, II等, "Cell", October 30, 2009, 139, 485.

[0021] [NPL 12] V.Gaboriau-Routhiau等, "Immunity", October 16, 2009, 31, 677

[0022] [NPL 13] N.H.Salzman等, "Nat Immunol", 11, 76.

[0023] [NPL 14] K.M.Maslowski等, "Nature", October 29, 2009, 461, 1282

[0024] [NPL 15] L.F.Lu, A.Rudensky, "Genes Dev", June 1, 2009, 23, 1270

[0025] [NPL 16] S.Sakaguchi, T.Yamaguchi, T.Nomura, M.Ono, "Cell", May 30, 2008, 133, 775

[0026] [NPL 17] C.L.Maynard等, "Nat Immunol", September 2007, 8, 931

[0027] [NPL 18] Y.P.Rubtsov等, "Immunity", April 2008, 28, 546

[0028] [发明概述]

[0029] [技术问题]

[0030] 本发明是鉴于传统技术中的上述问题而进行的。因此,本发明的一个目的是鉴定诱导调节性T细胞的增殖或积累的肠道共生细菌。本发明的另一个目的是提供包含所鉴定的肠道共生细菌或由其获得的生理活性物质,并因此诱导调节性T细胞(Treg细胞)的增殖或积累的组合物等。

[0031] [问题的解决方案]

[0032] 本发明人进行了认真的研究以解决上述问题。结果,本发明人发现获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理的级分和孢子形成级分诱导结肠中调节性T细胞(Treg细胞)的积累。此外,本发明人已发现属于梭菌属的细菌诱导结肠中调节性T细胞的增殖或积累。本发明人还发现由这些细菌诱导的调节性T细胞阻遏效应T细胞的增殖。而且,本发明人还发现属于梭菌属的细菌的定殖和所造成的Treg细胞的增殖或积累调节局部和全身免疫反应。

[0033] 根据这些发现,本发明人已发现利用属于梭菌属的细菌、其孢子或由其获得的生

理活性物质使得可能诱导调节性T细胞 (Treg细胞) 的增殖或积累, 并进一步阻遏免疫功能。

[0034] 更具体地, 本发明具有以下方面:

[0035] (1) 一种诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物, 所述组合物包含选自以下 (a) 至 (c) 组成的组的至少一种物质作为活性成分:

[0036] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0037] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液; 和

[0038] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0039] (2) 根据权利要求1所述的组合物, 其中

[0040] 所述调节性T细胞是转录因子Foxp3阳性的调节性T细胞或产生IL-10的调节性T细胞。

[0041] (3) 根据(1)和(2)中任一项所述的组合物, 其中

[0042] 所述组合物具有免疫阻遏效应。

[0043] (4) 根据(1)至(3)中任一项所述的组合物, 其中

[0044] 所述组合物是药物组合物。

[0045] (5) 一种在个体(如, 有相应需要的个体, 诸如需要诱导调节性T细胞的增殖或积累的个体) 中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法, 所述方法包括向个体施用选自以下 (a) 至 (c) 组成的组的至少一种物质的步骤:

[0046] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0047] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液; 和

[0048] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0049] (6) 一种在个体(如, 有相应需要的个体, 诸如需要诱导调节性T细胞的增殖或积累的个体) 中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法, 所述方法包括向所述个体施用针对革兰氏阴性细菌的抗生素的步骤。并且所述抗生素可以单独施用或与选自以下 (a) 至 (c) 组成的组的至少一种物质组合施用:

[0050] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0051] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液; 和

[0052] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0053] (7) 一种在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法, 所述方法包括向个体施用选自以下组成的组的至少一种物质的步骤: 扁桃仁皮、菊糖、低聚果糖、棉子糖、乳果糖、果胶、半纤维素、支链淀粉、乙酰-Co A、生物素、甜菜糖蜜、酵母提取物和抗性淀粉。

[0054] (8) 根据(5)至(7)中任一项所述的方法, 其中还向所述个体施用治疗组合物。

[0055] 注意, “治疗组合物” 在这里意指除(5)和(6)中所述的(a)-(c)、(6)中所述的针对革兰氏阴性细菌的抗生素或(7)中所述的物质以外的物质。

[0056] (9) 根据(8)所述的方法, 其中

[0057] 所述治疗组合物是选自以下组成的组的至少一种组合物: 皮质类固醇、美沙拉嗪、氨水杨酸、柳氮磺吡啶、柳氮磺吡啶衍生物、免疫阻遏药物、环孢菌素A、硫嘌呤、硫唑嘌呤、泼尼松、甲氨蝶呤、抗组胺剂、糖皮质激素、肾上腺素、茶碱、色甘酸钠、抗白三烯剂、抗胆碱能鼻炎药物、抗胆碱能减充血剂、肥大细胞稳定剂、单克隆抗-IgE抗体、疫苗和其组合。

[0058] (10) 根据(5)至(9)中任一项所述的方法, 其中

[0059] 选自由IL-10表达的增加、CTLA4表达的增加、IDO表达的增加和IL-4表达的阻遏组成的一种测量用作所述个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的指标。

[0060] (11) 一种在个体(如,其个体)中抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向所述个体施用针对革兰氏阳性细菌的抗生素的步骤。

[0061] (12) 根据(5)至(11)中任一项所述的组合物,其中

[0062] 所述调节性T细胞是转录因子Foxp3阳性调节性T细胞或产生IL-10的调节性T细胞。

[0063] (13) 一种疫苗组合物,包含选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质:

[0064] (a) 属于梭菌属的细菌;

[0065] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分中的细菌孢子;和

[0066] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分中的细菌。

[0067] (14) 一种在个体(如,有相应需要的个体,诸如需要治疗、降低其严重度或预防至少一种此类疾病的个体)中治疗、辅助治疗、降低其严重度或预防选自传染性疾病和自身免疫性疾病的至少一种疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用根据(13)所述的疫苗组合物。

[0068] (15) 一种筛选具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括:

[0069] (I) 由选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质准备测试物质:

[0070] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0071] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

[0072] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0073] (II) 准备其中在IL-10基因表达控制下表达报告基因的非人哺乳动物;

[0074] (III) 使所述测试物质与所述非人哺乳动物接触;

[0075] (IV) 在与所述测试物质接触后,检测所述非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达报告基因的细胞,和确定所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;

[0076] (V) 检测未与所述测试物质接触的非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达报告基因的细胞,和确定所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;和

[0077] (VI) 将(IV)中确定的数目或比例与(V)中确定的数目或比例进行比较,和当(IV)中确定的数目或比例大于(V)中确定的数目或比例时,确定所述测试物质是促进Treg细胞的增殖或积累的化合物。

[0078] (16) 一种非人哺乳动物,用于根据(15)所述的方法,且其中所述报告基因在IL-10基因表达控制下表达。

[0079] (17) 一种从属于梭菌属的细菌样品中分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括(I)至(III):

[0080] (I) 从所述属于梭菌属的细菌样品制备基因组DNA;

[0081] (II) 将所述基因组DNA插入克隆系统,和制备来自所述属于梭菌属的细菌样品的基因文库;和

[0082] (III) 通过利用步骤(II)中获得的基因文库分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物。

[0083] (18) 一种治疗方法,包括(I)至(III):

[0084] (I) 测量受试者的微生物群中梭菌IV簇和XIV簇的百分比和/或绝对量;

[0085] (II) 将它们与健康个体中的相同测量值进行比较;和

[0086] (III) 如果与所述健康个体相比检测到所述受试者中梭菌IV簇、XIV簇的数目/量的统计学显著的降低,则向所述受试者施用一种物质,其中所述物质是选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质:

[0087] (a) 根据权利要求1至4中任一项所述的物质;

[0088] (b) 针对革兰氏阴性细菌的抗生素;和

[0089] (c) 根据权利要求7所述的物质。

[0090] (19) 一种监测方法,包括(I)至(II):

[0091] (I) 施用选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质后,测量受试者中梭菌IV簇、XIV簇的水平:

[0092] (a) 根据权利要求1至4中任一项所述的物质,

[0093] (b) 针对革兰氏阴性细菌的抗生素,和

[0094] (c) 根据权利要求7所述的物质;和

[0095] (II) 如果所述水平增加,则判断为所述受试者有利地响应的体征。

[0096] [发明的有益效果]

[0097] 含有属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质作为活性成分的本发明的组合物是诱导调节性T细胞(Treg细胞)的增殖或积累的极佳组合物。可通过施用作为药物产品的本发明的组合物或作为食品或饮料摄取所述组合物来阻遏活生物体中的免疫性。因此、本发明的组合物可用于,例如预防或治疗自身免疫性疾病或变应性疾病,以及阻遏器官移植中的免疫排斥等。另外,如果食品或饮料诸如健康食品包含本发明的组合物,则健康个体可容易和常规地摄取所述组合物。作为结果,可能诱导调节性T细胞的增殖或积累并从而提高免疫功能。

[0098] [附图简述]

[0099] [图1]图1是显示产生I110^{venus}小鼠的方法的示意图。

[0100] [图2]图2是显示为了分析I110^{venus}小鼠是否具有I110^{venus}等位基因进行的DNA印迹的结果的图。

[0101] [图3]图3是显示当从I110^{venus}小鼠分选Venus⁺阳性细胞和Venus⁻阴性细胞时获得的结果的FACS点图。

[0102] [图4]图4是显示当通过实时RT-PCR分析I110^{venus}小鼠的Venus阳性细胞和Venus⁻阴性细胞中表达的IL-10mRNA的量时获得的结果的图。

[0103] [图5]图5是显示SPF小鼠的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的变化的图。

[0104] [图6]图6显示FACS点图,该图显示从GF小鼠和SPF小鼠的小肠、结肠和外周淋巴结分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果。

[0105] [图7]图7是显示从GF小鼠和SPF小鼠的小肠、结肠和外周淋巴结分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0106] [图8]图8显示了示出从GF小鼠和SPF小鼠的小肠、结肠和外周淋巴结分离的CD4⁺Foxp3⁺细胞的数目的分析结果的图。

[0107] [图9]图9是显示用抗生素处理的SPF小鼠的各种组织中的CD4⁺细胞中的Venus⁺细胞的比例的分析结果的点列图。

[0108] [图10]图10显示FACS点图,该图显示从施用了SPF小鼠粪便悬浮液的GF小鼠结肠固有层中分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果。

[0109] [图11]图11是显示从施用了SPF小鼠粪便悬浮液的GF小鼠的结肠固有层和小肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0110] [图12]图12是显示从具有ILF、PP和结肠斑缺陷的小鼠的固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中的Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0111] [图13]图13显示FACS点图,该图显示了从施用特定的共生细菌的GF小鼠的结肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果。

[0112] [图14]图14显示示出从施用特定的共生细菌的GF小鼠的结肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0113] [图15]图15是显示从其中定殖了特定的共生细菌的小鼠的结肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中IFN- γ ⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0114] [图16]图16是显示从其中定殖了特定的共生细菌的小鼠的结肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中IL-17⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0115] [图17]图17是显示从各自具有病原体相关的分子模式识别受体相关因子缺陷的各种SPF小鼠的结肠分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0116] [图18]图18是显示从其中定殖了梭菌属的Myd88^{-/-}小鼠的结肠固有层分离的CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例的分析结果的图。

[0117] [图19]图19显示FACS点图,该图显示从I110^{Venus}小鼠的各种组织分离的淋巴细胞中Venus⁺细胞的比例的分析结果。

[0118] [图20]图20是FACS点图,该图显示从I110^{Venus}小鼠的结肠固有层分离的淋巴细胞的细胞表面上的T细胞受体 β 链的表达的分析结果。

[0119] [图21]图21显示FACS点图,该图显示从I110^{Venus}小鼠的结肠固有层分离的淋巴细胞中IL-17、IL-4和IFN- γ 的表达的分析结果。

[0120] [图22]图22显示示出脾Foxp3⁻CD4⁺细胞、脾Foxp3⁺CD4⁺细胞、结肠固有层Venus⁺细胞和小肠固有层Venus⁺细胞中表达的IL-10、CTLA4、Foxp3和GITR的mRNA的量的分析结果的图。

[0121] [图23]图23显示FACS点图,该图显示GF I110^{Venus}小鼠和SPF I110^{Venus}小鼠的小肠固有层和结肠固有层中CD4、Foxp3和Venus的表达的分析结果。

[0122] [图24]图24显示FACS点图,该图显示SPF I110^{Venus}小鼠的各种组织中CD4细胞的Venus和Foxp3表达的分析结果。

[0123] [图25]图25显示FACS点图,该图显示其中定殖了特定的共生细菌的I110^{Venus}小鼠中Foxp3和Venus的表达的分析结果。

[0124] [图26]图26是显示其中定殖了特定的共生细菌的I110^{venus}小鼠的小肠中CD4⁺细胞的Foxp3和/或Venus的表达的分析结果的图。

[0125] [图27]图27是显示其中定殖了特定的共生细菌的I110^{venus}小鼠的结肠的CD4⁺细胞中Foxp3和/或Venus的表达的分析结果的图。

[0126] [图28]图28是显示从用抗生素处理的I110^{venus}小鼠的各种组织分离的CD4⁺细胞中Venus⁺细胞的比例的分析结果的点列图。

[0127] [图29]图29是显示来自其中定殖了梭菌属的GF I110^{venus}小鼠的结肠固有层的CD4⁺Venus⁺细胞、来自SPF I110^{venus}小鼠的结肠固有层的CD4⁺Venus⁺细胞和来自Foxp3^{eGFP}报告小鼠的脾的CD4⁺GFP⁺细胞的免疫调节功能的分析结果的图。

[0128] [图30]图30是显示当用多粘菌素B或万古霉素处理SPF B6小鼠4周,并且然后分析CD4⁺细胞群中Foxp3⁺细胞的比例时获得的结果的图。

[0129] [图31]图31是显示当向GF小鼠口服施用来自SPF小鼠的氯仿处理的粪便,并且然后分析CD4⁺细胞群中Foxp3⁺细胞的比例时获得的结果的图。

[0130] [图32]图32是显示SPF小鼠、GF小鼠、定殖乳杆菌属的小鼠或定殖梭菌属的小鼠的胸腺或结肠中的LP淋巴细胞中的Helios表达的流式细胞术分析的总体结果的图。

[0131] [图33]图33显示示出了SPF小鼠、GF小鼠、定殖乳杆菌属的小鼠或定殖梭菌属的小鼠的胸腺或结肠中的LP淋巴细胞中的CD4表达、Foxp3表达和Helios表达的流式细胞术分析的代表性结果的点列图。

[0132] [图34]图34是显示当培养从GF小鼠、定殖乳杆菌属的小鼠或定殖梭菌属的小鼠获得的完整结肠,并通过ELISA分析其培养上清液的TGF- β 1浓度时获得的结果的图。

[0133] [图35]图35是显示当培养由GF小鼠或定殖梭菌属的小鼠获得的肠上皮细胞(IEC),并通过ELISA分析其培养上清液的TGF- β 1浓度时获得的结果的图。

[0134] [图36]图36是显示当在抗-TGF- β 抗体存在或不存在下将脾CD4⁺T细胞与抗-CD3抗体和与从GF小鼠或定殖了梭菌属(Clost.)的46个细菌菌株的小鼠分离的IEC的培养上清液一起培养,并且在培养的第5天收集T细胞并通过实时RT-PCR分析Foxp3表达时获得的结果的图。

[0135] [图37]图37是显示当向C57BL/6GF小鼠口服接种梭菌属(Clost.)的46个细菌菌株或乳杆菌属(Lacto.)的三个细菌菌株,并在接种后三周收集IEC并通过实时RT-PCR分析MMP2基因的相对mRNA表达水平时获得的结果的图。

[0136] [图38]图38是显示当向C57BL/6GF小鼠口服接种梭菌属(Clost.)的46个细菌菌株或乳杆菌属(Lacto.)的三个细菌菌株,并在接种后三周收集IEC并通过实时RT-PCR分析MMP9基因的相对mRNA表达水平时获得的结果的图。

[0137] [图39]图39是显示当向C57BL/6GF小鼠口服接种梭菌属(Clost.)的46个细菌菌株或乳杆菌属(Lacto.)的三个细菌菌株,并在接种后三周收集IEC并通过实时RT-PCR分析MMP13基因的相对mRNA表达水平时获得的结果的图。

[0138] [图40]图40是显示当向C57BL/6GF小鼠口服接种梭菌属(Clost.)的46个细菌菌株或乳杆菌属(Lacto.)的三个细菌菌株,并在接种后三周收集IEC并通过实时RT-PCR分析IDO基因的相对mRNA表达水平时获得的结果的图。

[0139] [图41]图41是显示当用2%DSS处理对照小鼠(SPF)和施用梭菌属的小鼠(SPF+

Clost.) ,持续六天观察和测量体重损失、粪便硬度和出血,并然后以数值评估时获得的结果的图。

[0140] [图42]图42是显示用2%DSS处理对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) 后第6天收集的结肠的状态的照片。

[0141] [图43]图43显示显微照片,该显微照片显示当用2%DSS处理对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) ,并在第6天收集其结肠并通过HE染色进行组织学分析时获得的结果。

[0142] [图44]图44是显示当用噁唑酮使对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) 敏化,并且随后用1%噁唑酮/50%乙醇溶液处理每个直肠的内部,并测量体重损失时获得的结果的图。

[0143] [图45]图45显示显微照片,该显微照片显示当用噁唑酮使对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) 敏化,并且随后用1%噁唑酮/50%乙醇溶液处理每个直肠的内部,并通过HE染色对处理获得的结肠进行组织学分析时获得的结果。

[0144] [图46]图46是显示当通过以2周间隔两次施用明矾吸附的卵清蛋白 (OVA) 免疫对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) ,并从其中收集血清并通过ELISA分析OVA-特异性IgE的浓度时获得的结果的图。

[0145] [图47]图47是显示当通过以2周间隔两次施用明矾吸附的卵清蛋白 (OVA) 免疫对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) ,并收集脾细胞并通过体外OVA静止模拟分析这些脾细胞的IL-4产生时获得的结果的图。

[0146] [图48]图48是显示当通过以2周间隔两次施用明矾吸附的卵清蛋白 (OVA) 免疫对照小鼠 (SPF) 和施用梭菌属的小鼠 (SPF+Clost.) ,并收集脾细胞并通过体外OVA静止模拟分析这些脾细胞的IL-10产生时获得的结果的图。

[0147] [图49]图49是使用Mega软件通过邻接方法用得到的梭菌属的41个菌株的序列和从Genbank数据库获得的已知细菌的序列构建的系统树。

[0148] [图50]图50是显示来自GF小鼠 (无菌小鼠#1和#2) 或定殖了属于IV簇的三个梭菌属菌株的GF小鼠 (3个梭菌属菌株小鼠#1和#2) 的Foxp3表达门控的CD4细胞的直方图。

[0149] [图51]图51是显示来自GF小鼠 (GF) 或强饲了氯仿处理的人类粪便的GF小鼠 (GF+氯仿) 的CD4阳性淋巴细胞的Foxp3表达的直方图。

[0150] [图52]图52是显示来自GF小鼠 (GF) 或强饲了氯仿处理的人类粪便的GF小鼠 (GF+氯仿) 的CD4阳性淋巴细胞的Foxp3表达的直方图。

[0151] [图53]图53是显示强饲了氯仿处理的人类粪便的小鼠的粪便中梭菌属和拟杆菌属的量的图。

[0152] [实施方案的描述]

[0153] <具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应的组合物>

[0154] 本发明提供诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物,所述组合物包含选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质作为活性成分:

[0155] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0156] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

[0157] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0158] 在本发明中,“调节性T细胞”意指具有阻遏异常或过度免疫反应的功能并且在免疫耐受中起作用的T细胞。调节性T细胞通常是转录因子Foxp3阳性CD4⁺阳性T细胞。然而,本发明的调节性T细胞还包括转录因子Foxp3阴性调节性T细胞,只要该调节性T细胞是产生IL-10的CD4⁺阳性T细胞。

[0159] “诱导调节性T细胞的增殖或积累”在本发明中的含义包括诱导未成熟T细胞向调节性T细胞分化的效应,该分化导致调节性T细胞的增殖或积累。另外,“诱导调节性T细胞的增殖或积累”在本发明中的含义包括体内效应、体外效应和离体效应。因此,包括所有以下效应:通过施用或摄取属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质等在体内诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应;通过使属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质等作用于培养的调节性T细胞而诱导培养的调节性T细胞的增殖或积累的效应;和通过使属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质等作用于从活生物体收集并意图随后将其引入活生物体,诸如其所获自的生物体或另一生物体的调节性T细胞而诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应。诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应可例如如下评估。具体地,将属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质等口服施用于实验动物诸如无菌小鼠,然后分离结肠中的CD4⁺阳性细胞,并通过流式细胞术测量该CD4⁺阳性细胞中含有的调节性T细胞的比例(参考实施例7)。

[0160] 由本发明的组合物诱导增殖或积累的调节性T细胞优选是转录因子Foxp3阳性的调节性T细胞或产生IL-10的调节性T细胞。

[0161] 为本发明的组合物的活性成分的“属于梭菌属的细菌”,没有特别限制,只要该细菌具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应即可。所述细菌优选属于XIVa簇或IV簇。细菌的一个菌株可以单独用于本发明的组合物,但是细菌的两种或更多菌株可一起用于本发明的组合物。组合使用属于XIVa簇或IV簇的细菌的多个菌株可以对调节性T细胞产生优异的效果。除了属于这些簇的细菌之外,也可组合使用属于其他簇的细菌(例如,属于III簇的细菌)。如果使用细菌的多于一个菌株(如,属于XIVa簇的一种或多个菌株,属于IV簇的一种或多个菌株,属于XIVa簇或IV簇之外的簇的一种或多个菌株,诸如属于III簇的一种或多个菌株),所用的菌株的类型和数目可以广泛地变化。使用的类型和数目可以基于多种因素确定(如,期望的效应,诸如调节性T细胞的增殖或积累的诱导或抑制;待治疗、预防或降低严重度的疾病或病症;接受者的年龄或性别)。菌株可以存在于单一组合物中,在这种情况下,它们将被一起消耗或摄取,或可以存在于多于一种组合物中(如,各自可在单独的组合物中),在这种情况下它们可被单独消耗或所述组合物可以被合并并且消耗或摄取得到的组合(合并的组合物)。可以施用证明有效的任何数目或组合的菌株(如,1至200的任何数目,诸如1至100、1至50、1至40、1至30、1至20、1至10、1至5和其间的任何数目)。在本发明的某些实施方案中,使用文献(Itoh, K., and Mitsuoka, T. Characterization of Clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. Lab. Animals 19:111-118 (1985))中描述的46个菌株的一些或全部的组合。例如,可以使用所述的46个菌株中的至少一种、两种或更多、三种、三种或更多、四种、四种或更多、五种、五种或更多、六种、六种或更多或任何其他数目,包括46个菌株。它们可以彼此组合使用和与未在所引用的参考文献中描述的菌株组合(如,与属于III簇的一种或更多菌株组合)使用。

[0162] 注意,“属于梭菌属的细菌”的簇可以例如如下鉴定。具体地,属于梭菌属的细菌使用由SEQ ID NO 64和65组成的引物组(对于属于XIVa簇的梭菌属)或由SEQ ID NO 66和67组成的引物组(对于属于XIV簇的梭菌属)通过PCR分类(参考实施例18)。另外,属于梭菌属的细菌通过对使用由SEQ ID NO 19和20组成的引物组扩增的16S rRNA基因进行测序来分类(参考实施例7)。

[0163] 属于梭菌属的细菌的活细胞可用于本发明的组合物,而其死亡细胞也可用于所述组合物。另外,从热稳定性、抗生素抗性等以及长储存期的观点,属于梭菌属的细菌优选是孢子形式。

[0164] 本发明的“由属于梭菌属的细菌获得的生理活性物质”的含义包括细菌中含有的物质、细菌的分泌产物和细菌的代谢产物。此类生理活性物质可通过借助已知的纯化方法从所述细菌、其培养上清液或仅定殖了属于梭菌属的细菌的小鼠的肠道的肠道内容物纯化活性组分来鉴定。

[0165] 本发明的组合物中的活性成分“获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分”没有特别限制,只要该级分包括存在于哺乳动物的粪便中的形成孢子的细菌,并具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应即可。

[0166] 本发明的组合物中的活性成分“获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分”没有特别限制,只要该级分通过用氯仿(例如,3%氯仿)处理哺乳动物的粪便获得、并具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应即可。

[0167] 注意,在本发明中,“哺乳动物”没有特别限制,并且其实例包括人、小鼠、大鼠、牛、马、猪、绵羊、猴、狗和猫。

[0168] 同时,当在培养基中培养“获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分”或“获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分”时,细菌中含有的物质、细菌的分泌产物、细菌的代谢产物从该级分含有的细菌等释放。本发明的组合物中的活性成分“级分的培养上清液”的含义包括此类物质、分泌产物和代谢产物。培养上清液没有特别限制,只要该培养上清液具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应即可。培养上清液的实例包括培养上清液的蛋白级分、培养上清液的多糖级分、培养上清液的脂质级分和培养上清液的低分子量代谢产物级分。

[0169] 本发明的组合物可以是以下形式:药物组合物、食品或饮料(其还可以是动物饲料)或用于动物模型实验的试剂,所述药物组合物、食品或饮料和试剂具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应。本发明的一个实例揭示由属于梭菌属的细菌等诱导的调节性T细胞(Treg细胞)阻遏效应T细胞的增殖。因此,本发明的组合物可适宜用作具有免疫阻遏效应的组合物。免疫阻遏效应可例如如下评估。具体地,使从口服施用本发明的组合物的实验动物诸如小鼠分离的调节性T细胞作用于从脾分离的效应T细胞($CD4^+CD25^-$ 细胞),并且然后通过使用 $[^3H]$ -胸苷的摄取量作为指标测量其增殖能力(参考实施例14)。

[0170] 本发明的组合物可用作,例如,用于预防或治疗自身免疫性疾病诸如慢性炎性肠病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性硬化症或桥本病,或变应性疾病诸如花粉症或哮喘的药物组合物;用于阻遏器官移植中的排斥等的药物组合物;用于提高免疫功能的食品或饮料;或用于阻遏效应T细胞的增殖或功能的试剂。

[0171] 本发明的组合物的目标疾病的更多具体实例包括自身免疫性疾病、变应性疾病和

器官移植中的排斥等,诸如炎性肠病 (IBD)、溃疡性结肠炎、克罗恩病、口炎性腹泻、自身免疫性关节炎、类风湿性关节炎、I型糖尿病、多发性硬化、骨髓移植后移植物抗宿主病、骨关节炎、幼年型慢性关节炎、莱姆关节炎、银屑病关节炎、反应性关节炎、脊柱关节病、系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、甲状腺炎、哮喘、牛皮癣、皮炎硬皮病、特应性皮炎、移植物抗宿主病、急性或慢性与器官移植相关的免疫疾病、结节病、动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血、川崎病 (Kawasaki's disease)、格雷夫斯病 (Grave's disease)、肾病综合征、慢性疲劳综合征、韦格纳氏肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、过敏性紫癜 (Henoch-Schoenlejn purpura)、肾脏显微性血管炎、慢性活动性肝炎、葡萄膜炎、感染性休克、中毒性休克综合征、脓毒病综合征、恶病质、获得性免疫缺陷综合征、急性横贯性脊髓炎、亨廷顿氏舞蹈病、帕金森氏症、阿尔茨海默氏症、中风、原发性胆汁性肝硬化、溶血性贫血、多腺体缺陷I型综合征和多腺体缺陷II型综合征、施密特氏综合征 (Schmidt's syndrome)、成人 (急性)呼吸窘迫综合征、脱发、斑秃、血清反应阴性关节病、关节病、莱特氏病 (Reiter's disease)、银屑病性关节病、衣原体、耶尔森氏菌和沙门氏菌相关的关节病、脊柱关节病、动脉粥样硬化疾病/动脉硬化、特应性变态反应、食品过敏、自身免疫性大疱病、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、类天疱疮、线状IgA病、自身免疫性溶血性贫血、库姆斯阳性溶血性贫血、获得性恶性贫血、幼年型恶性贫血、肌痛脑炎/慢性疲劳综合征 (Royal Free Disease)、慢性皮肤粘膜念珠菌病、巨细胞动脉炎、原发性硬化性肝炎、隐源性自身免疫性肝炎、获得性免疫缺陷病综合征、获得性免疫缺陷相关的疾病、丙型肝炎、常见的变异型免疫缺陷病 (常见的变异型低丙种球蛋白血症)、扩张型心肌病、肺纤维化疾病、隐源性纤维化肺炎、炎症后间质性肺疾病、间质性肺炎、结缔组织病相关的间质性肺疾病、混合性结缔组织病相关性肺疾病、系统性硬化病相关的间质性肺疾病、类风湿性关节炎相关的间质性肺疾病、系统性红斑狼疮相关性肺疾病、皮肌炎/多肌炎相关性肺疾病、干燥综合征相关性肺疾病、强直性脊柱炎相关性肺疾病、血管炎弥漫性肺疾病、含铁血黄素沉着病相关性肺疾病、药物引起的间质性肺疾病、放射性纤维化、闭塞性细支气管炎、慢性嗜酸性粒细胞性肺炎、淋巴细胞浸润性肺疾病、感染后肺间质疾病、痛风性关节炎、自身免疫性肝炎、1型自身免疫性肝炎 (典型自身免疫性或狼疮样肝炎)、2型自身免疫性肝炎 (抗LKM抗体肝炎)、自身免疫介导的低血糖、B型胰岛素抵抗黑棘皮症、甲状旁腺功能减退、器官移植相关的急性免疫疾病、器官移植相关的慢性免疫疾病、骨关节炎、原发性硬化性胆管炎、特发性白细胞减少症、自身免疫性中性粒细胞减少、肾疾病NOS、肾小球肾炎、肾脏显微性血管炎、盘状红斑狼疮、红斑狼疮、特发性男性不育或NOS、精子自身免疫性疾病、多发性硬化症 (所有亚型)、不依赖胰岛素的糖尿病、交感性眼炎、结缔组织组织疾病继发性肺动脉高压、肺出血肾炎综合征 (Goodpasture's syndrome)、肺部表现的结节性多动脉炎、急性类风湿热、类风湿性脊椎炎、斯蒂尔氏病 (Still's disease)、系统性硬化症、高安氏病 (Takayasu's disease)/动脉炎、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少症、自身免疫性甲状腺疾病、甲状腺功能亢进、甲状腺肿自身免疫性甲状腺功能减退 (桥本氏病)、萎缩性自身免疫性甲状腺功能减退症、原发性粘液水肿、晶状体源性葡萄膜炎、原发性小血管炎、白癜风、过敏性鼻炎 (花粉过敏)、过敏性反应、宠物过敏、乳胶过敏、药物过敏、过敏性鼻结膜炎、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性细胞增多综合征、嗜酸性细胞性胃肠炎皮肤红斑性狼疮、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性细胞增多综合征和嗜酸性细胞性胃肠炎。

[0172] 本发明的组合物还可用于在由于免疫性引起的过度炎症造成的对传染性疾病的抗性受损的个体中预防或治疗传染性疾病的药物组合物。

[0173] 损害宿主稳态的维持或恢复、并最终导致这种免疫病理学组织损伤的传染性病原体的实例包括沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*) (其引起结核病)、原生动物 (其引起疟疾)、丝虫属 (其引起丝虫病)、血吸虫属 (*Schistosoma*) (其引起血吸虫病)、弓形体属 (*Toxoplasma*) (其引起弓形体病)、利什曼原虫属 (*Leishmania*) (其引起利什曼病)、HCV和HBV (其引起丙型肝炎和乙型肝炎) 和单纯疱疹病毒 (其引起疱疹)。

[0174] 可通过已经知的药物制剂方法由本发明的组合物制备药物制剂例如, 本发明的组合物可以以下列形式口服或胃肠外使用: 胶囊剂、片剂、丸剂、液体、粉末、颗粒剂、细颗粒剂、薄膜包衣制剂、丸剂、锭剂、舌下制剂、咀嚼剂、含服制剂、膏剂、糖浆剂、混悬剂、酏剂、乳剂、搽剂、软膏剂、硬膏剂、糊剂、透皮吸收系统、洗剂、吸入剂、气雾剂、注射剂、栓剂等。

[0175] 为了配制这些制剂, 本发明的组合物可以与药学上可接受的载体或对于食品或饮料可接受的载体适当地组合使用, 具体地, 与无菌水、生理盐水、植物油、溶剂、基质、乳化剂、悬浮剂、表面活性剂、稳定剂、调味剂、芳香剂、赋形剂、媒介物、防腐剂、粘合剂、稀释剂、等渗调节剂、安抚剂、填充剂、崩解剂、缓冲剂、包衣剂、润滑剂、着色剂、甜味剂、增稠剂、调味矫正剂、增溶剂、其他添加剂等适当地组合使用。

[0176] 同时, 对于配制其药物制剂, 且特别是对于配制用于口服施用的药物制剂, 从更有效地诱导结肠中调节性T细胞的增殖或积累的角度考虑, 优选组合使用能够将本发明的组合物有效递送到结肠的组合物。

[0177] 能够递送到结肠的此类组合物或方法没有特别限制, 且可以根据需要采用已知的组合物或方法。其实例包括pH敏感型组合物, 更具体地, 肠溶聚合物, 肠溶聚合物在通过胃之后当pH变为碱性时释放它们的内容物。当使用pH敏感型组合物配制药物制剂时, 优选pH敏感型组合物是组合物分解的pH阈值为6.8至7.5的聚合物。这样的数值范围是在胃的远端部分当pH向碱性侧转变时的范围, 并因此是用于递送到结肠的合适范围。

[0178] 此外, 能够递送到结肠的组合物的另一个实例是通过延迟内容物释放大约3至5小时来确保递送到结肠的组合物, 3至5小时对应于小肠通过时间。在使用延迟释放的组合物配制药物制剂的实例中, 使用水凝胶作为壳。水凝胶在与胃肠液接触后水化和膨胀, 从而有效释放内容物。而且延迟释放剂量单位包括具有包衣或选择性包衣药物的材料的含药物的组合物。此类选择性包衣材料的实例包括体内降解聚合物、可逐渐水解的聚合物、可逐渐水溶的聚合物和/或可酶降解的聚合物。有效延迟释放的优选包衣材料没有特别限制, 且其实例包括基于纤维素的聚合物诸如羟丙基纤维素、丙烯酸聚合物和共聚物诸如甲基丙烯酸聚合物和共聚物和乙烯聚合物和共聚物诸如聚乙烯吡咯烷酮。

[0179] 能够递送到结肠的组合物的实例还包括特异地粘附到结肠粘膜的生物粘附性组合物 (例如, 美国专利第6,368,586号的说明书中描述的聚合物), 和掺入了蛋白酶抑制剂以保护特定的生物药物制剂在胃肠道中不会由于蛋白酶的活性而分解的组合物。

[0180] 能够递送到结肠的系统的实例是通过压力变化将组合物递送到结肠的系统, 方式是通过利用由在胃的远端部分的细菌发酵中的气体产生引起的压力变化释放内容物。此类系统没有特别限制, 并且其更具体的实例是内容物分散在栓剂基质中并且用疏水性聚合物

(例如,乙基纤维素)包衣的胶囊。

[0181] 能够递送到结肠的系统的另一个实例是将组合物递送到结肠的系统,该系统被结肠中存在的酶(例如,碳水化合物水解酶或碳水化合物还原酶)特异地分解。此类系统没有特别限制,且其更具体实例包括使用食品组分诸如非淀粉多糖、直链淀粉、黄原胶和偶氮聚合物的系统。

[0182] 当用作药物组合物时,本发明的组合物可以与已知的用于免疫阻遏的药物组合物组合使用。此类已知的药物组合物没有特别限制,并且可以是选自由以下组成的组的至少一种治疗组合物:皮质类固醇、美沙拉嗪、氨水杨酸、柳氮磺吡啶、柳氮磺吡啶衍生物、免疫阻遏药物、环孢菌素A、巯嘌呤、硫唑嘌呤、泼尼松、甲氨蝶呤、抗组胺剂、糖皮质激素、肾上腺素、茶碱、色甘酸钠、抗白三烯剂、抗胆碱能鼻炎药物、抗胆碱能减充血剂、肥大细胞稳定剂、单克隆抗-IgE抗体、疫苗(优选其中变应原的量逐渐增加的用于接种的疫苗)和其组合。优选将这些治疗组合物与本发明的组合物组合使用。

[0183] 当本发明的组合物用作食品或饮料时,该食品或饮料可以是,例如,健康食品、功能食品、用于指定健康用途的食品、膳食补充物、患者用的食品或动物饲料。本发明的食品或饮料可以以上文所述的组合物形式摄取,也可以以各种食品和饮料摄取。食品和饮料的具体实例包括各种饮料诸如果汁、清凉饮料、茶饮料、饮料制剂、果冻饮料和功能性饮料;酒精饮料,诸如啤酒;含碳水化合物的食品,诸如大米食品产品、面条、面包和面食;糊制品,诸如鱼火腿、香肠、海鲜糊制品;蒸煮袋产品,诸如咖喱、沾有厚淀粉调味料的食品和中国汤;汤;乳制品,诸如牛奶、乳饮料、冰淇淋、奶酪和酸奶;发酵产品,诸如发酵大豆糊剂、酸奶、发酵饮料和腌菜;豆制品;各种糖果产品,诸如西方糖果产品(包括饼干、曲奇等)、日本糖果产品(包括蒸豆果酱包子、软赤豆果冻等)、糖果、口香糖、软糖、冷甜点(包括果冻、奶油焦糖和冰冻甜点);即食食品,诸如速食汤和速食大豆汤;微波炉加热的食品;等等。另外,实例还包括以粉末、颗粒、片、胶囊、液体、糊剂和果冻形式制备的健康食品和饮料。本发明的组合物可用于包括人类在内的动物。除了人类以外的动物,没有特别的限制,并且该组合物可用于各种家畜、家禽、宠物、实验动物等。动物的具体实例包括猪、牛、马、绵羊、山羊、鸡、野鸭、鸵鸟、家鸭、狗、猫、兔、仓鼠、小鼠、大鼠、猴等,但动物不限于这些。

[0184] 不希望受理论束缚,在本发明中,其中属于厚壁菌门组(梭菌IV和XIVa簇所属的组)的细菌的相对丰度大的个体比其中属于拟杆菌门组的细菌的相对丰度大的个体获得更多体重。因此,本发明的组合物能够调节营养素的吸收和改善饲料效力。从这样的观点考虑,本发明的组合物可用于促进体重增加或用于饲料效力良好的动物饲料。

[0185] 此外,向不含抗生素的动物饲料加入本发明的组合物可能使摄入该动物饲料的受试者的体重增加至等于或高于含有抗生素的动物饲料达到的水平,并且还可能使胃中的致病性细菌降低至等于含有抗生素动物饲料达到的水平。因此,本发明的组合物可用于不需加入抗生素的动物饲料。

[0186] 另外,与不易掺入家畜生产的商业用途中的常规细菌(乳杆菌和双歧杆菌)不同,孢子形式的本发明的组合物可以制丸、喷雾或容易地与动物饲料混合,并且还可加入到饮水中。

[0187] 使用本发明的组合物的此类动物饲料的饲喂没有特别限制,并且可以以选择性方式定期饲喂给受试者,或可以在某些时间段饲喂(例如,出生时、断奶期间或当被饲喂的受

试者迁移或装运时)。

[0188] 此外,从以上所述的观点考虑,本发明的组合物可优选用于营养不良的人。换言之,当摄入所述组合物的受试者是人时,本发明的组合物还可优选用于促进体重增加和增强自食品的能量吸收。

[0189] 本发明的食品或饮料可通过技术领域中公知的生产技术生产。可以向食品或饮料中加入对于通过免疫阻遏效应提高免疫功能有效的一种或更多组分(例如,营养素)。另外,该食品或饮料可与展示出免疫功能提高之外的功能的另一组分或另一功能食品组合,从而充当多功能食品或饮料。

[0190] 此外,本发明的组合物可以优选地掺入需要可能破坏普通的益生菌菌株的加工步骤的食品。具体地,大多数商业使用的益生菌菌株不能掺入到需要通过热处理、长期储存、冷冻处理、机械应力处理和高压处理(例如,挤压成型或滚压成型)中的任何一种进行加工的食品。另一方面,由于形成孢子的有益性质,本发明的组合物可容易地掺入到此类加工食品。

[0191] 例如,孢子形式的本发明的组合物可以甚至在干燥的食品中存活,并且甚至可以在被摄取后存活。相似地,本发明的组合物可以耐受低温灭菌工艺,通常是在70℃至沸点温度(包括两个端点)的范围内的工艺。因此,本发明的组合物可以掺入到所有种类的膳食产品中。而且,本发明的组合物可以耐受多年的长期储存;高温加工诸如烘烤和煮沸;低温加工诸如冷冻和冷藏;和高压处理诸如挤压成型和滚压成型。

[0192] 需要在此类严苛条件下加工的食品没有特别限制,并且其实例包括需要在微波炉中加工才能食用的食品(例如,燕麦片)、需要烘烤才能食用的食品(例如,松饼)、需要经受短时间高温处理灭菌才能食用的食品(例如,牛奶)和需要加热才能饮用的食品(例如,热茶)。

[0193] 当施用或摄取本发明的组合物时,用于施用或摄取的本发明的组合物的量根据受试者的年龄、体重、症状、健康状况、组合物的种类(药物产品、食品或饮料等)等酌情进行选择。例如,每次施用或摄取量一般是0.01mg/kg体重至100mg/kg体重,且优选1mg/kg体重至10mg/kg体重。本发明还提供阻遏受试者的免疫性的方法,该方法特征在于,所述受试者如上所述地施用或摄取属于梭菌属的细菌或由该细菌获得的生理活性物质。

[0194] 本发明的组合物的产品(药物产品、食品或饮料或试剂)或其手册可提供有说明该产品可用于阻遏免疫性的注意事项(包括说明该产品具有免疫阻遏效应的注意事项,和说明该产品具有阻遏效应T细胞的增殖或功能的注意事项)。这里,“关于产品或其手册标注注意事项的规定”意指在产品的主体、容器、包装等上提供注意事项,或手册、包装插页、活页或其他印刷品上提供注意事项,该注意事项公开关于产品的信息。

[0195] <诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法>

[0196] 如上所述和如实施例中将显示的,向个体施用本发明的组合物使得可能在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累。因此,本发明可提供一种在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向个体施用选自以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质的步骤:

[0197] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0198] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

[0199] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0200] 注意,“个体”在本发明中没有特别限制,且其实例包括人、各种家畜、家禽、宠物、实验动物等。“个体”可以处于健康状态或疾病状态。

[0201] 此外,如后面将描述的实施例5中所显示的,革兰氏阳性共生细菌在调节性T细胞的增殖或积累中起关键作用。因此,本发明还可提供一种在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向个体施用针对革兰氏阴性细菌的抗生素的步骤。

[0202] 在本发明中,“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”没有特别限制,且其实例包括氨基糖苷类抗生素(丁胺卡那霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、奈替米星、妥布霉素和巴龙霉素)、头孢菌素类抗生素(头孢克罗、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯、头孢呋辛、头孢克肟、头孢地尼、头孢妥仑、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他啶、头孢布烯、头孢唑肟、头孢曲松和cefoxotin)、磺胺类药物、氨基青霉素和链霉素。不希望受理论束缚,根据本发明的“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”优选是减少革兰氏阴性细菌并有助于革兰氏阳性细菌的定殖的抗生素。

[0203] 此外,在上胃肠道中不被分解并促进肠道微生物在肠道中的生长的益生组合物诸如扁桃仁皮、菊糖、低聚果糖、棉子糖、乳果糖、果胶、半纤维素(诸如木葡聚糖和 α -葡聚糖)、支链淀粉和抗性淀粉,以及生长因子诸如乙酰辅酶A、生物素、甜菜糖蜜和酵母提取物,有助于属于梭菌属的细菌的增殖。因此,本发明还可提供一种在个体中诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向个体施用选自由这些物质组成的组的至少一种物质的步骤。

[0204] 同时,在本发明的“诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法”中,本发明的组合物、上述“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”和上述“益生组合物或生长因子”可组合使用。此类组合使用没有特别限制,且组合使用的实例如下:事先向个体施用“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”,并且然后施用本发明的组合物;向个体同时施用“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”和本发明的组合物;事先向个体施用“益生组合物或生长因子”,并且然后施用本发明的组合物;向个体同时施用“益生组合物或生长因子”和本发明的组合物;向个体同时施用或在任何合适的时间单独施用本发明的组合物、“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”和“益生组合物或生长因子”。

[0205] 此外,可将治疗组合物与选自由本发明的组合物、“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”和“益生组合物或生长因子”组成的组的至少一种物质一起向个体施用。

[0206] 此类治疗组合物没有特别限制,并且可以是选自由以下组成的组的至少一种治疗组合物:皮质类固醇、美沙拉嗪、氨水杨酸、柳氮磺吡啶、柳氮磺吡啶衍生物、免疫阻遏药物、环孢菌素A、巯嘌呤、硫唑嘌呤、泼尼松、甲氨蝶呤、抗组胺剂、糖皮质激素、肾上腺素、茶碱、色甘酸钠、抗白三烯剂、抗胆碱能鼻炎药物、抗胆碱能减充血剂、肥大细胞稳定剂、单克隆抗-IgE抗体、疫苗(优选其中变应原的量逐渐增加的用于接种的疫苗)和其组合。优选将这些治疗组合物与上述物质组合使用。

[0207] 此外,与选自由本发明的组合物、“针对革兰氏阴性细菌的抗生素”和“益生组合物或生长因子”组成的组的至少一种物质组合使用的治疗组合物没有特别限制。例如,向个体口服或胃肠外地同时施用或在任何合适的时间单独施用“一种物质”和治疗组合物。

[0208] 此外,在上述“诱导调节性T细胞的增殖或积累的方法”中,本发明的组合物等的施

用实际上是否诱导调节性T细胞的增殖或积累可通过使用选自以下组成的组的至少一种的增加或加强作为指标来确定：调节性T细胞的数目、结肠T细胞群中调节性T细胞的比例、调节性T细胞的功能和调节性T细胞的标志物的表达。优选使用选自以下组成的组的一种测量：IL-10表达的增加、CTLA4表达的增加、IDO表达的增加和IL-4表达的阻遏作为诱导调节性T细胞的增殖或积累的指标。

[0209] 注意，检测此类表达的方法的实例包括在转录水平检测基因表达的RNA印迹、RT-PCR和点印迹；和在翻译水平检测基因表达的ELISA、放射免疫测定、免疫印迹、免疫沉淀和流式细胞术。

[0210] 同时，用于测量此类指标的样品没有特别限制，且其实例包括来自个体的血液样品和活检中获得的组织块。

[0211] <预测个体对本发明组合物的响应和/或个体的预后的方法>

[0212] 本发明可提供以下方法，其中确定个体的微生物群中属于梭菌属的细菌的绝对量或比例，并且当属于梭菌属的细菌的比例或绝对值与通过对处于典型健康状态的个体进行的相似测定获得的基线值相比降低时，确定所述个体可能对本发明的组合物响应。

[0213] 在一个实施方案中，提供了预测受试者对物质的响应和/或受试者的预后的方法。所述方法包括测量受试者的微生物群中梭菌IV簇和XIV簇的百分比或绝对量，并将它们与原型健康受试者中的相同测量的基线值进行比较，其中梭菌IV簇和/或XIV簇的绝对量或百分比水平的降低表明受试者可能有利地响应于本发明的组合物。

[0214] 在一个实施方案中，所述方法还包括测量施用所述物质后受试者的微生物群的组成，其中施用本发明的组合物后属于IV簇、XIV簇的梭菌属的百分比或绝对数目相对于施用之前的增加是增强的免疫阻遏(或免疫调节)的正指示物。受试者的微生物群的组成的测量可用本领域中已知的技术进行，诸如用16srRNA测序进行。

[0215] 注意，在这些实施方案中，所述物质是选自以下(a)至(e)组成的组的至少一种物质：

[0216] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质；

[0217] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液；

[0218] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液；

[0219] (d) 根据本发明的针对革兰氏阴性细菌的抗生素；和

[0220] (e) 选自以下组成的组的至少一种物质：扁桃仁皮、菊糖、低聚果糖、棉子糖、乳果糖、果胶、半纤维素(诸如木葡聚糖和 α -葡聚糖)、支链淀粉、乙酰辅酶A、生物素、甜菜糖蜜、酵母提取物和抗性淀粉。

[0221] <抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法>

[0222] 如后面将描述的实施例5中所显示的，革兰氏阳性共生细菌在调节性T细胞的增殖或积累中起关键作用。因此，本发明还可提供一种在个体中抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法，所述方法包括向个体施用针对革兰氏阳性细菌的抗生素的步骤。

[0223] 在本发明中，“针对革兰氏阳性细菌的抗生素”没有特别限制，且其实例包括头孢菌素类抗生素(头孢氨苄、头孢呋辛、头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢克罗、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯和头孢托罗(ceftobiprole))、氟喹诺酮类抗生素(环丙沙星(cipro)、左氟沙星(Levaquin)、氧氟沙星(floxin)、加替沙星(tequin)、莫西沙星(avelox)

和诺氟沙星(norfloxx)、四环素类抗生素(四环素、米诺环素、土霉素和多西环素)、青霉素类抗生素(阿莫西林、氨苄西林、青霉素V、双氯青霉素、羧苄西林、万古霉素和甲氧西林);和碳青霉烯抗生素(厄他培南、多利培南、亚胺培南/西司他丁和美罗培南)。

[0224] 如上所述,“个体”在本发明中没有特别限制,且其实例包括人、各种家畜、家禽、宠物、实验动物等。个体”可以处于健康状态或疾病状态。此类疾病状态没有特别限制,且其实例包括经受癌症免疫疗法和患有传染性疾病的状态。

[0225] 此外,作为“抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法”的另一种方式,本发明可提供一种在个体中抑制调节性T细胞的增殖或积累的方法,所述方法包括向个体施用针对抗原的抗体、抗体片段和肽的任何一种的步骤,所述抗原为选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质:

[0226] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0227] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

[0228] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0229] <疫苗组合物和使用疫苗组合物治疗或预防传染性疾病或自身免疫性疾病的方法>

[0230] 如上所述和如后面将描述的实施例15中所显示的,梭菌属对结肠中Treg细胞的诱导在局部和全身免疫反应中具有重要作用。因此,本发明还可提供“一种疫苗组合物,其包含选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质:(a) 属于梭菌属的细菌;(b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分中的细菌孢子;和(c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分中的细菌”和“在个体中治疗、辅助治疗、降低其严重度或预防选自传染性疾病和自身免疫性疾病的至少一种疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用所述疫苗组合物”。

[0231] 注意,此类“自身免疫性疾病”没有特别限制,且其实例包括如在<具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应的组合物>中的“目标疾病的具体实例”所描述的那些。“传染性疾病”也没有特别限制,且其实例包括与<具有诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应的组合物>中“传染性病原体的实例”中描述的“传染性病原体”相关的传染性疾病。

[0232] <筛选具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法>

[0233] 本发明还可提供一种筛选具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括:

[0234] (1) 由选自由以下(a)至(c)组成的组的至少一种物质准备测试物质:

[0235] (a) 属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质;

[0236] (b) 获自哺乳动物的粪便样品的孢子形成级分或所述级分的培养上清液;和

[0237] (c) 获自哺乳动物的粪便样品的氯仿处理级分或所述级分的培养上清液。

[0238] (2) 准备其中在IL-10基因表达控制下表达报告基因的非人哺乳动物;

[0239] (3) 使所述测试物质与所述非人哺乳动物接触;

[0240] (4) 在与述测试物质接触后,检测所述非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达报告基因的细胞,和确定所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;

[0241] (5) 检测未与所述测试物质接触的非人哺乳动物的CD4⁺Foxp3⁺细胞群中表达报告

基因的细胞,和确定所述CD4⁺ Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞的数目或所述CD4⁺ Foxp3⁺细胞群中表达所述报告基因的细胞与所述CD4⁺ Foxp3⁺细胞群中不表达所述报告基因的细胞的比例;和

[0242] (6) 将步骤(4)中确定的绝对数目或比例与(5)中确定的数目或比例进行比较,和当(4)中确定的数目或比例大于(5)中确定的数目或比例时,确定所述测试物质是促进Treg细胞的增殖或积累的化合物。

[0243] 根据本发明的“测试物质”没有特别限制,只要所述测试物质是由选自由物质(a)至(c)组成的组的至少一种物质制备的物质即可。测试物质的实例包括由选自由上述物质(a)至(c)组成的组的至少一种物质获得的蛋白质、多糖、脂质和核酸。

[0244] 根据本发明的“其中在IL-10基因表达控制下表达报告基因的非人哺乳动物”没有特别限制,只要所述非人哺乳动物是具有表达受IL-10基因表达控制区(例如,启动子或增强子)控制的报告基因的非人哺乳动物即可。此类报告基因的实例包括编码荧光蛋白(例如,GFP)的基因和编码萤光素酶的基因。作为根据本发明的“其中在IL-10基因表达控制下表达报告基因的非人哺乳动物”,可以优选使用稍后在实施例中显示的I110^{venus}小鼠。

[0245] 根据本发明的“接触”没有特别限制,且其实例包括将测试物质口服或胃肠外(例如,腹膜内注射或静脉内注射)施用给非人哺乳动物。

[0246] 本发明还可提供用于所述方法的非人哺乳动物,且其中所述报告基因在IL-10基因表达控制下表达。

[0247] 而且,本发明还可提供一种从属于梭菌属的细菌样品中分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物的方法,所述方法包括以下步骤(1)至(3):

[0248] (1) 从所述属于梭菌属的细菌样品制备基因组DNA;

[0249] (2) 将所述基因组DNA插入克隆系统,和制备来自所述属于梭菌属的细菌样品的基因文库;和

[0250] (3) 通过利用步骤(2)中获得的基因文库分离具有促进调节性T细胞的增殖或积累活性的化合物。

[0251] 在此类步骤中,制备和分离的方法没有特别限制,且可以根据需要使用用于体外或体内系统的已知技术。此外,通过此方法分离的化合物没有特别限制,且其实例包括由属于梭菌属的细菌获得的核酸(例如,DNA、mRNA和rRNA)以及由属于梭菌属的细菌获得的多肽和蛋白。

[0252] <根据本发明的其他实施方式>

[0253] 除了上述实施方式之外,本发明还可提供以下实施方式。

[0254] 具体地,本发明还可提供一种确定个体中的微生物群的组成的方法,其中向个体施用本发明的组合物之后属于梭菌属的细菌的比例或绝对数目相对于施用之前的比例或绝对数目的增加用作免疫阻遏增加的指标。在此类方法中,确定微生物群的组成的方法没有特别限制,且可以根据需要使用已知的技术(例如,16S rRNA测序)。

[0255] 本发明还可提供一种测量Treg细胞的分化的方法,其中向个体施用本发明的组合物之后个体中Treg细胞的分化相对于施用之前的增加可用作免疫阻遏(或免疫调节)增加的指标。

[0256] 此外,本发明的组合物还可施用于处于抗生素治疗的个体。施用的时间没有特别

限制,且例如,本发明的组合物可以在抗生素治疗之前或与其同时施用。同时,从抗生素抗性的观点考虑,本发明的组合物优选以孢子形式施用。

[0257] 此外,在此类施用的优选方式中,本发明的组合物在例如针对革兰氏阳性细菌的抗生素施用之后或与其同时施用。注意,此类“针对革兰氏阳性细菌的抗生素”没有特别限制,且其实例包括头孢菌素类抗生素(头孢氨苄、头孢呋辛、头孢羟氨苄、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢克罗、头孢孟多、头孢西丁、头孢丙烯和头孢托罗);氟喹诺酮类抗生素(环丙沙星、左氟沙星、氧氟沙星、加替沙星、莫西沙星和诺氟沙星);四环素类抗生素(四环素、米诺环素、土霉素和多西环素);青霉素类抗生素(阿莫西林、氨苄西林、青霉素V、双氯青霉素、羧苄西林、万古霉素和甲氧西林);和碳青霉烯类抗生素(厄他培南、多利培南、亚胺培南/西司他丁和美罗培南)。

[0258] 同时,在此类施用的另一优选方式中,本发明的组合物在使用例如万古霉素、甲硝哒唑、利奈唑胺、雷莫拉宁或非达霉素的治疗之后(或与其同时)施用。

[实施例]

[0259] 下面基于实施例更具体地描述本发明。然而,本发明不限于下面的实施例。

[0260] 注意,实施例中使用的老鼠是如下制备或产生的。在下面的描述中,老鼠在被提及时可在其前面带有“SPF”或“GF”。这些“SPF”和“GF”分别表明老鼠维持在不存在特定病原体细菌(无特定病原体SPF)条件下,和老鼠维持在无菌(GF)条件下。

[0261] <老鼠>

[0262] 维持在SPF或GF条件下的C57BL/6、Balb/c和IQR老鼠购自Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (日本)、JAPAN SLC, INC. (日本)、CLEA Japan, Inc. (日本)或The Jackson Laboratory (USA)。GF老鼠和定菌老鼠饲喂和维持在The University of Tokyo、Yakult Central Institute for Microbiological Research或Sankyo Labo Service Corporation, Inc的定菌设施内。Myd88^{-/-}、Rip2^{-/-}和Card9^{-/-}老鼠按非专利文献1至3中的描述产生,并回交8代或更多代,以得到C57BL/6遗传背景。Foxp3^{eGFP}老鼠购自Jackson Laboratory。

[0263] <I110^{venus}老鼠>

[0264] 为了形成在I110启动子控制下的编码I110和Venus的双顺反子基因座,首先创建了靶向构建体。具体地,将盒(IRES-Venus-SV40polyA信号盒,参考非专利文献4)插入到I110基因的终止密码子和polyA信号(外显子5)之间,该盒由内部核糖体进入位点(IRES)、黄色荧光蛋白(Venus)和SV40polyA信号(SV40polyA)构成,并紧邻新霉素抗性基因(neo)排列。接下来,使用获得的靶向构建体以引起与老鼠基因组中的I110基因区的同源重组。由此产生具有I110^{venus}等位基因的I110^{venus}老鼠(参考图1)。注意,在图1中,“tk”代表编码胸苷激酶的基因,“neo”代表新霉素抗性基因,和“BamH1”代表限制性酶BamH1的切割位点。

[0265] 从I110^{venus}老鼠中提取基因组DNA,用BamH1处理,并通过使用图1中显示的探针进行DNA印迹。图2显示了获得的结果。野生型和I110^{venus}等位基因分别检测为具有19kb和5.5kb大小的条带。因此,如从图2中显示的结果明显的,发现图1中显示的同源重组在I110^{venus}老鼠的基因组中发生。

[0266] 另外,通过使用FACS Aria分选I110^{venus}老鼠的结肠固有层中的CD4⁺Venus⁻细胞或

CD4⁺Venus⁺细胞。然后,通过稍后描述的方法在ABI 7300系统上进行实时RT-PCR,以确定表达的IL-10mRNA的量。图3和4显示了获得的结果。如从图3和4中显示的结果明显的,发现由于仅在CD4⁺Venus⁺细胞中检测到了IL-10mRNA的形成,I110^{venus}小鼠中IL-10mRNA的表达正确地反映于Venus的表达。注意,此类I110^{venus}小鼠的无菌状态是在Central Institute for Experimental Animals (Kawasaki, Japan)建立的。将处于无菌状态的I110^{venus}小鼠维持在Sankyo Labo Service Corporation, Inc. (Tokyo, Japan)的乙烯隔绝箱中,并用于以下实施例。

[0267] 同时,如下进行实施例中的实验和分析。

[0268] <向小鼠定殖细菌的方法及其分析>

[0269] 根据非专利文献5和6中的描述,产生了其中定殖SFB或梭菌属的小鼠。将获得的定菌小鼠的盲肠内容物或粪便溶解在无菌水或厌氧稀释溶液中。将溶解的盲肠内容物或粪便原样或在氯仿处理后口服施用于GF小鼠。将乳杆菌属的3个菌株和拟杆菌属的16个菌株以厌氧方式彼此分开地培养在BL或EG琼脂培养基中。收获培养的细菌、悬浮于厌氧TS肉汤和强制口服施用于GF小鼠。通过对粪便颗粒的涂片制备物进行显微观察评估小鼠中细菌的定殖状态。

[0270] <细胞分离和流式细胞术>

[0271] 为了从结肠固有层和小肠固有层分离淋巴细胞,收集小肠和结肠,并纵向切开。然后,洗涤以除去其中的粪便内容物等。随后,将小肠和结肠在含有5mM EDTA的HBSS中在37℃下振荡20分钟。除去上皮和脂肪组织后,将肠组织切成小片。向这些小片中加入RPMI 1640 (4%胎牛血清(FBS)、1mg/ml胶原酶D、0.5mg/ml分散酶和40μg/ml DNA酶I(全部由Roche Diagnostics K.K.生产)),然后将混合物在保持在37℃的水浴中振荡1小时。消化的组织用含有5mM EDTA的HBSS洗涤,并重悬于5ml 40%percoll (GE Healthcare)。将悬浮液覆盖于15-ml Falcon管中的2.5ml 80%percoll上。然后在室温和2000rpm进行离心20分钟,以通过percoll密度梯度离心进行细胞分离。收集界面处的细胞,并用作固有层淋巴细胞。将收集的细胞悬浮在染色缓冲液(PBS、2%FBS、2mM EDTA和0.09%NaN₃)中,并通过使用PE或PE-Cy7标记的抗-CD4抗体(RM4-5, BD Biosciences)进行染色。CD4染色之后,通过使用Cytofix/Cytoperm Kit Plus with Golgistop (BD Biosciences)或Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience)以及用Alexa647标记的抗-Foxp3抗体(FJK-16s, eBioscience)对细胞中的Foxp3进行染色。流式细胞术通过使用FACScant II进行,并通过FlowJo软件(TreeStar Inc.)分析数据。细胞的分选通过使用FACS Aria进行。

[0272] <实时RT-PCR>

[0273] 由使用RNeasy Mini Kit (Qiagen)制备的RNA,通过使用MMV反转录酶(Promega KK)合成cDNA。所获得的cDNA通过使用Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)和ABI 7300实时PCR系统(Applied Biosystems)的实时RT-PCR,或使用SYBR Premix Ex Taq (TAKARA)和Light Cycler 480的实时RT-PCR进行分析。对于每个样品,将获得的值对GAPDH的量进行标准化。引物组通过使用Primer Express Version 3.0 (Applied Biosystems)设计,并选择在初始评估中表现出90%或更高序列同一性的那些。使用的引物组如下所示:

[0274] Foxp3

- [0275] 5'-GGCAATAGTTCCTTCCCAGAGTT-3' (SEQ ID NO:1)
[0276] 5'-GGGTCGCATATTGTGGTACTTG-3' (SEQ ID NO:2)
[0277] CTLA4
[0278] 5'-CCTTTTGTAGCCCTGCTCACTCT-3' (SEQ ID NO:3)
[0279] 5'-GGGTCACCTGTATGGCTTCAG-3' (SEQ ID NO:4)
[0280] GITR
[0281] 5'-TCAGTGCAAGATCTGCAAGCA-3' (SEQ ID NO:5)
[0282] 5'-ACACCGGAAGCCAAACACA-3' (SEQ ID NO:6)
[0283] IL-10
[0284] 5'-GATTTTAATAAGCTCCAAGACCAAGGT-3' (SEQ ID NO:7)
[0285] 5'-CTTCTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA-3' (SEQ ID NO:8)
[0286] GAPDH
[0287] 5'-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3' (SEQ ID NO:9)
[0288] 5'-TCTCCACTTTGCCACTGCAA-3' (SEQ ID NO:10)
[0289] Mmp2
[0290] 5'-GGACATTGTCTTTGATGGCA-3' (SEQ ID NO:11)
[0291] 5'-CTTGTCACGTGGTGTCACTG-3' (SEQ ID NO:12)
[0292] Mmp9
[0293] 5'-TCTCTGGACGTCAAATGTGG-3' (SEQ ID NO:13)
[0294] 5'-GCTGAACAGCAGAGCCTTC-3' (SEQ ID NO:14)
[0295] Mmp13
[0296] 5'-AGGTCTGGATCACTCCAAGG-3' (SEQ ID NO:15)
[0297] 5'-TCGCCTGGACCATAAAGAA-3' (SEQ ID NO:16)
[0298] Idol
[0299] 5'-AGAGGATGCGTGACTTTGTG-3' (SEQ ID NO:17)
[0300] 5'-ATACAGCAGACCTTCTGGCA-3' (SEQ ID NO:18)。

[0301] <大肠上皮细胞 (IEC) 的制备和培养>

[0302] 首先,收集结肠,纵向切开,并用PBS润洗。随后,将结肠用1mM二硫苏糖醇 (DTT) 在37℃在振荡仪上处理30分钟,然后涡旋一分钟以破坏上皮完整性。收集释放的IEC,并悬浮于5ml 20%percoll。将悬浮液覆盖于15-ml Falcon管中的2.5ml 80%percoll上。然后,将管在25℃和780g离心20分钟以通过percoll密度梯度离心进行细胞分离。收集界面处的细胞,并用作结肠IEC (纯度:90%或更高,存活率:95%)。将由此收集获得的IEC悬浮于含有10%FBS的RPMI中,并将 1×10^5 个IEC细胞在24-孔板中培养24小时。之后,收集培养上清液,并通过ELISA (Promega) 测量活性TGF- β 1水平。

[0303] 同时,对于体外T细胞培养,在存在或不存在25ug/ml抗-TGF- β 抗体 (R&D) 下,将 1.5×10^5 个MACS纯化的脾CD4⁺ T细胞与其中培养从GF小鼠或定殖梭菌属的小鼠分离的IEC的50%条件培养基一起和与25ng/ml hIL-2 (Peprotech) 一起培养在圆底96-孔板的每个孔中。注意,圆底平板结合了10g/ml抗-CD3抗体和抗-CD28抗体 (BD Bioscience)。5天培养之后,收集CD4⁺ T细胞,并进行实时PCR。

[0304] <结肠炎实验模型>

[0305] 将定殖梭菌属的小鼠的粪便悬浮液口服施用给C57BL/6小鼠(2周龄),并在常规环境中培养六周。

[0306] 为了制备DSS诱导的结肠炎模型,将2%(wt/vol) DSS(试剂级,DSS盐,分子量=36至50kD,由MP Biomedicals生产)与饮用水一起施用于小鼠,持续六天。

[0307] 同时,为了制备噻唑酮诱导的结肠炎模型,通过在小鼠上透皮应用150 μ l 3%噻唑酮(4-乙氧基亚甲基-2-苯基-2-噻唑啉-5-酮,Sigma-Aldrich)/100%乙醇溶液将小鼠预先敏化。五天之后,在轻度麻醉下向预先敏化的小鼠再次直肠内施用150 μ l 1%噻唑酮/50%乙醇溶液。注意,直肠内施用通过使用3.5F导管进行。

[0308] 每天分析每只小鼠的体重、潜血、肉眼可见的出血(总出血)和粪便硬度。此外,以数值评估体重损失百分比、肠出血(无出血、潜血(hemoccult+)或肉眼可见的出血)和粪便硬度(正常粪便、稀粪或腹泻),并根据“S.Wirtz,C.Neufert,B.Weigmann,M.F.Neurath,Nat Protoc 2,541(2007)”中的描述计算疾病活性指数(DAI)。

[0309] <OVA特异性IgE反应>

[0310] 向BALB/c SPF小鼠接种定殖梭菌属的小鼠(2周龄)的粪便悬浮液,并且在常规环境中培养。然后,向小鼠(在4周龄和6周龄时)腹膜内注射总共0.2ml的1g OVA(V级,Sigma)和2mg明矾(Thermo Scientific)。每周从小鼠的尾根部收集血清,并通过ELISA(Chondrex)测量OVA-特异性IgE。然后,在其8周龄时,收集脾细胞,以每孔 1×10^6 个细胞接种到96-孔板,并用OVA(100 μ g/ml)刺激三天。之后,收集培养上清液,并通过ELISA(R&D)测量IL-4和IL-10水平。

[0311] <统计分析>

[0312] 对照和实验组之间的差异通过学生t-检验评估。

[0313] (实施例1)

[0314] 首先,研究结肠固有层中调节性T细胞(Treg细胞)的积累是否依赖于共生细菌。具体地,从不存在特定病原性细菌(SPF)下饲养的Balb/c小鼠的外周淋巴结(pLN)或从该小鼠的结肠固有层或小肠(SI)中分离淋巴细胞。CD4和Foxp3通过抗体染色。然后,通过流式细胞术分析CD4⁺淋巴细胞中Foxp3⁺细胞的比例。图5显示了获得的结果。如从图5中显示的结果明显的,发现Foxp3⁺ Treg细胞以高频率存在于在无特定病原性微生物(SPF)环境下保持的小鼠的胃肠道的固有层,特别是结肠固有层。另外,还发现结肠固有层中Foxp3⁺ Treg细胞的数目逐渐增加直至其出生后三个月,而外周淋巴结中Foxp3⁺ Treg细胞的数目从出生后两周基本保持恒定。

[0315] (实施例2)

[0316] 接下来,研究了实施例1中发现的结肠中Treg细胞的时间积累是否与肠道共生微生物群的定殖有关系。具体地,分析了从在无菌(GF)或SPF环境下饲养的小鼠(8周龄:Balb/c小鼠、IQI小鼠和C57BL/6小鼠)的小肠、结肠和外周淋巴结分离的淋巴细胞中CD4的表达和Foxp3的表达。在三次或更多次的独立实验中获得了相似的结果。图6和7显示了获得的结果。注意,在图7中,每个白色圈代表个体小鼠中CD4⁺ Foxp3⁺细胞的绝对数目,而误差棒代表标准偏差(SD)。

[0317] 另外,从SPF小鼠和GF小鼠(Balb/c小鼠或C57BL/6小鼠)收集固有层淋巴细胞。CD4

和Foxp3用抗体染色。然后,通过FACS分析固有层淋巴细胞。图8显示了获得的结果。注意,在图8中,每个白色圈代表个体小鼠中CD4⁺ Foxp3⁺细胞的绝对数目,**表示“P<0.001”,和*表示“P<0.01。”

[0318] 另外,从随水口服施用抗生素八周的小鼠 (SPF C57BL/6小鼠) 的结肠固有层、小肠固有层 (SI)、派尔集合淋巴结 (PP) 和肠系膜淋巴结 (MLN) 分离淋巴细胞。CD4和Foxp3用抗体染色。然后,通过FACS分析淋巴细胞。在两次或更多次独立实验中获得了相似的结果。图9显示了获得的结果 (个体小鼠的CD4⁺细胞中Foxp3⁺细胞的比例)。注意,根据以下文献的描述组合使用以下抗生素:

[0319] 氨苄西林 (A;500mg/L,Sigma)

[0320] 万古霉素 (V;500mg/L,NACALAI TESQUE,INC.)

[0321] 甲硝哒唑 (M;1g/L,NACALAI TESQUE,INC.)

[0322] 新霉素 (N;1g/L,NACALAI TESQUE,INC.)

[0323] Rakoff-Nahoum,J.Paglino,F.Eslami-Varzaneh,S.Edberg,R.Medzhitov,Cell 118,229 (Jul 23,2004)

[0324] Fagarasan等,Science 298,1424 (Nov 15,2002)

[0325] 在图9中,每个白色圈代表个体小鼠中CD4⁺ Foxp3⁺细胞的绝对数目,每个水平棒代表绝对数目的平均值,*表示“P<0.01”,和“AVMN”通过使用抗生素的首字母代表施用的抗生素的种类。

[0326] 如从图6至9中显示的结果明显的,GF小鼠的小肠和外周淋巴结中Foxp3⁺CD4⁺细胞的频率和绝对数目等于或大于SPF小鼠的那些 (参考图6至8)。另外,口服施用抗生素八周的SPF小鼠的小肠固有层、派尔集合淋巴结和肠系膜淋巴结中Treg细胞的数目等于或大于SPF小鼠的那些 (参考图9)。同时,GF小鼠的结肠固有层中Foxp3⁺CD4⁺细胞的数目与SPF小鼠的数目相比显著下降 (参考图6和7)。在不同遗传背景的小鼠 (Balb/c、IQI和C57BL/6) 之间、以及在不同动物设施饲养的小鼠之间共同地观察到这一下降 (关于不同遗传背景的数据参考图7,关于在不同动物设施饲养的小鼠的数据未在附图中显示)。另外,还显示施用抗生素的SPF C57BL/6小鼠的结肠固有层中Treg细胞的数目显著下降 (参考图9)。

[0327] (实施例3)

[0328] 接下来,直接检查实施例2中显示的GF小鼠的结肠固有层中Treg细胞的数目的下降是否归因于微生物群的不存在。具体地,向GF-IQI小鼠口服施用购自The Jackson Laboratory的B6SPF小鼠的粪便悬浮液 (惯例化)。施用三周后,从结肠固有层分离淋巴细胞,并分析CD4⁺淋巴细胞中的Foxp3的表达。图10和11显示了获得的结果。注意,图11中的每个白色圈代表个体小鼠中CD4⁺ Foxp3⁺细胞的绝对数目,误差棒代表标准偏差 (SD),*表示学生t-检验中“P<0.01”,并且**表示“P<0.001”。如从图10和11中显示的结果明显的,小肠固有层中Treg细胞的数目没有变化。然而,结肠固有层中Treg细胞的数目显著增加。因此,说明宿主-微生物相互作用在结肠固有层中Foxp3⁺ Treg细胞的积累中起重要作用,而小肠固有层中Treg细胞的积累具有不同的机制。

[0329] (实施例4)

[0330] 接下来,根据M.N.Kweon等,J Immunol 174,4365 (Apr 1,2005) 中描述的方法研究了小鼠的肠相关淋巴样组织和小鼠的结肠固有层中Foxp3⁺细胞的数目之间的关系。具体

地,将100 μ g胞外域重组蛋白(淋巴毒素 β 受体(LT β R)和人IgG1的Fc区之间的融合蛋白(LT β R-Ig),参考Honda等,J Exp Med 193,621(Mar 5,2001))腹膜内注射到受孕后14天的怀孕C57BL/6小鼠。再次将LT β R-Ig腹膜内注射到由这种小鼠获得的胎儿,以产生从中完全去除单独的淋巴滤泡(ILF)、派尔集合淋巴结(PP)和结肠斑(CP)的小鼠。然后,通过FACS分析用LT β R-Ig处理的小鼠和用大鼠IgG处理的小鼠(对照)的结肠固有层中的CD4⁺细胞中Foxp3⁺细胞的比例。图12显示了获得的结果。注意,在图12中,每个白色圈代表个体小鼠中Foxp3⁺细胞的比例,并且误差棒代表标准偏差。如从图12中显示的结果明显的,发现单独的淋巴滤泡、派尔集合淋巴结和结肠斑缺陷的小鼠(用LT β R-Ig处理的小鼠)的结肠固有层中Foxp3⁺细胞的比例反而是增加的。因此,这表明GF小鼠和用抗生素治疗的小鼠的结肠固有层中Treg细胞的数目的降低是由于促进结肠固有层中Treg细胞的积累和由肠道微生物引起的特定信号的传播没有发生,而不是简单地由于无组织的肠相关的淋巴样组织的继发效应。

[0331] (实施例5)

[0332] 为了研究特定的肠道菌群是否诱导结肠Treg细胞的积累,将万古霉素作为针对革兰氏阳性细菌的抗生素或多粘菌素B作为针对革兰氏阴性细菌的抗生素施用给SPF小鼠(自4周年龄)持续四周,并分析CD4⁺细胞群中Foxp3⁺细胞的比例(CD4中的Foxp3⁺[%])。图30显示了获得的结果。注意,在图30中,“SPF”表示SPF小鼠(对照)的结果,“polyB”表示施用多粘菌素B的SPF小鼠的结果,和“Vanco.”表示施用万古霉素的SPF小鼠的结果。同时,*表示“P<0.01”。

[0333] 如从图30中显示的结果明显的,施用万古霉素的小鼠的结肠中Treg细胞的数目与对照的数目相比显著下降。相比之下,未观察到施用多粘菌素B对小鼠Treg细胞的数目的影响。这些事实表明革兰氏阳性共生细菌在Treg细胞的积累中起主要作用。

[0334] (实施例6)

[0335] 最近的报道表明形成孢子的细菌在肠道T细胞反应中起重要作用(参见V.Gaboriau-Routhiau等,Immunity 31,677(Oct 16,2009))。在这一方面,将耐受3%氯仿的粪便微生物(形成孢子的级分)口服施用于GF小鼠,然后分析CD4⁺细胞群中Foxp3⁺细胞的比例(CD4中的Foxp3⁺[%])。图31显示了获得的结果。注意,在图31中,“GF”表示GF小鼠的结果,并且“+chloro”表示施用了氯仿处理的粪便的GF小鼠的结果。同时,**表示“P<0.001”。

[0336] 如从图31中显示的结果明显的,施用氯仿处理的粪便三周后,施用小鼠中Treg细胞的数目显著增加到与强制施用未处理的粪便的SPF小鼠和GF小鼠的数目相同的水平(参见图7和11)。

[0337] 因此,组合考虑实施例5中显示的结果,这揭示了本土微生物群的特定组分很可能属于革兰氏阳性组,并且孢子形成级分在Treg细胞诱导中起重要作用。

[0338] (实施例7)

[0339] 接下来,鉴定了实施例4至6中表明诱导结肠中Treg细胞的积累的肠道微生物群的物种。具体地,将分节丝状菌(SFB)、拟杆菌属的16个菌株(Bacteroides(普通拟杆菌(B.vulgatus)的6个菌株、B.acidifaciens组1的7个菌株和B.acidifaciens组2的3个菌株)、乳杆菌的3个菌株(Lactobacillus(嗜酸乳杆菌(L.acidophilus)、发酵乳杆菌(L.fermentum)和L.murinum))和梭菌属的46个菌株(Clostridium,参考“Itoh,K.,and Mitsuoka,T.Characterization of Clostridia isolated from faeces of limited flora mice

and their effect on caecal size when associated with germ-free mice. *Lab. Animals* 19:111-118 (1985)”)或从在常规环境下饲养的小鼠 (SPF) 收集的微生物群口服施用于GF-Balb/c小鼠或GF-IQI小鼠。将小鼠在乙烯隔绝箱中维持三周。然后,从这些小鼠的结肠和小肠分离CD4细胞。通过流式细胞术分析结肠和小肠中Treg细胞的数目。

[0340] 图13显示当对Balb/c小鼠的CD4⁺细胞设置门控时获得的FACS点图。图14显示每只小鼠的CD4⁺细胞中Foxp3⁺细胞的比例。

[0341] 注意,属于梭菌属的细菌通过如下对16S rRNA基因进行测序来分类。具体地,细菌的16S rRNA基因通过PCR使用16S rRNA基因特异性引物对:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO:19) 和5'-ATTACCGCGGCKGCTG-3' (SEQ ID NO:20) 来扩增(参见T.Aebischer等, *Vaccination prevents Helicobacter pylori-induced alterations of the gastric flora in mice*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46,221-229 (2006))。然后将1.5-kb PCR产物引入pCR-Blunt载体。对插入序列进行测序并使用ClustalW软件程序进行比对。从梭菌属的46个菌株的菌株1-41获得的16S rRNA基因的所得序列以SEQ ID NO:21-61显示。使用Mega软件通过邻接方法用得到的梭菌属的41个菌株的序列和从Genbank数据库获得的已知细菌的序列构建的系统树显示于图49。

[0342] 如从图13和14中显示的结果明显的,在定殖分节丝状菌 (SFB) 的GF小鼠中未观察到对结肠中Treg细胞的数目的影响(参考图14)。此外,其中定殖乳杆菌的三个菌株的混合物的小鼠产生相似的结果(参考图14)。另一方面,显示在定殖了梭菌属的46个菌株的小鼠中强烈诱导结肠固有层中Foxp3⁺细胞的积累。重要的是,这种积累的促进与小鼠的遗传背景无关,并且尽管仅定殖了单一属的肠道微生物群,这种积累导致与SPF小鼠中的增加相似的数目增加。还显示,梭菌属的定殖没有改变小肠固有层中Treg细胞的数目(参考图14)。注意,当定殖拟杆菌属的16个菌株时,结肠中的Treg细胞的数目显著增加。然而,增加的程度取决于细菌定殖的小鼠的遗传背景而变化(参考图13和14)。

[0343] (实施例8)

[0344] 接下来,通过流式细胞术分析SPF小鼠、GF小鼠、定殖乳杆菌的小鼠和定殖梭菌属的小鼠的胸腺和结肠的LP淋巴细胞中的CD4表达、Foxp3表达和Helios表达。

[0345] 图32和33显示了获得的结果。注意,在图32和33中,“GF”或“无菌”表示GF小鼠的结果,“SPF”表示SPF小鼠的结果,“Lacto.”表示定殖乳杆菌的小鼠的结果,并且“Clost.”表示定殖梭菌属的小鼠的结果。在图32中,竖直轴代表Foxp3⁺细胞群中Helios⁻细胞的比例(Foxp3⁺中的Helios⁻[%]),和**表示“P<0.001”。

[0346] 如从图32和33中显示的结果明显的,SPF小鼠或定殖梭菌属的小鼠中发现的大多数Foxp3⁺细胞不表达Helios。注意,Helios是已知在由胸腺获得的天然Treg细胞中表达的转录因子(参见A.M.Thornton等, *J Immunol* 184,3433 (Apr 1,2010))。因此,这表明SPF小鼠和定殖梭菌属的小鼠中的大多数Treg细胞是在外周部分中诱导的Treg细胞,即所谓的iTreg细胞。

[0347] (实施例9)

[0348] 接下来,研究了梭菌属等的定殖是否对其他T细胞有影响。具体地,在GF IQI小鼠中定殖SFB、拟杆菌属的16个菌株 (Bactero.)、梭菌属的46个菌株 (Clost.) 或从在常规环境下饲养的小鼠收集的微生物群 (SPF)。三周后,从这些小鼠中分离结肠固有层中的淋巴细

胞,并在Golgistop(BD Bioscience)存在下用PMA(50ng/ml)和离子霉素(1 μ g/ml)刺激四小时。给予刺激后,通过使用抗-IL-17PE抗体(TC11-18H10)和抗-IFN- γ FITC抗体(BD Bioscience)根据cytofix/cytoperm试剂盒(BD Bioscience)的手册对胞内细胞因子进行染色。然后,通过流式细胞术分析CD4⁺淋巴细胞中IFN- γ ⁺细胞或IL-17⁺细胞的比例。图15和16显示了获得的结果。注意,在图15和16中,每个白色圈代表每个个体小鼠中CD4⁺IFN- γ ⁺细胞的绝对数目或CD4⁺IL-17⁺细胞的绝对数目,并且误差棒代表标准偏差(SD)。如从图15和16中显示的结果明显的,梭菌属的定殖对结肠中的Th1细胞(CD4⁺IFN- γ ⁺细胞)没有任何影响,并且仅引起Th17细胞(CD4⁺IL-17⁺细胞)的轻微增加。因此,这表明梭菌属是特异地诱导Treg细胞的细菌属。

[0349] (实施例10)

[0350] 已报告梭菌属的46个菌株对结肠中CD8⁺肠道上皮内淋巴细胞(IEL)的积累具有影响。因此,可以想象梭菌属在不同方面调节免疫系统,并且梭菌属展现出诱导和维持Treg细胞特别是结肠中的Treg细胞的显著能力,如上所述。另外,已知一种细胞因子,转化生长因子- β (TGF- β),在Treg细胞产生的调节中起重要作用。

[0351] 从这考虑,检查了梭菌属的定殖是否提供富含TGF- β 的结肠环境。具体地,首先,将GF小鼠、定殖梭菌属的小鼠和定殖乳杆菌的小鼠的完整结肠培养24小时,并且通过ELISA测量其培养上清液的活性TGF- β (TGF- β 1)的浓度(分析的小鼠的数目为每组四只)。图34显示了获得的结果。注意,在图34中,“GF”表示GF小鼠的结果,“Clost.”表示定殖梭菌属的小鼠的结果,和“Lacto.”表示定殖乳杆菌的小鼠的结果。同时,*表示“P<0.02”,和**表示“P<0.001”。

[0352] 如从图34中显示的结果明显的,定殖梭菌属的小鼠的结肠中产生的TGF- β 的量显著大于GF小鼠和定殖乳杆菌的小鼠产生的量。

[0353] 接下来,将GF小鼠和定殖梭菌属的小鼠的肠上皮细胞(IEC)培养24小时,并通过ELISA测量其培养上清液的活性TGF- β (TGF- β 1)的浓度(分析的小鼠的数目为每组四只)。图35显示了获得的结果。注意,在图35中,“GF”表示GF小鼠的结果,和“Clost.”表示定殖梭菌属的小鼠的结果。同时,**表示“P<0.001”。

[0354] 如从图35中显示的结果明显的,在从定殖梭菌属的小鼠分离的IEC的培养上清液中检测到TGF- β ,而在从GF小鼠分离的IEC的培养上清液中没有检测到TGF- β 。

[0355] 接下来,如上所述,在存在或不存在抗-TGF- β 抗体下,将脾CD4⁺T细胞与其中培养从GF小鼠或定殖梭菌属的小鼠分离的IEC的50%条件培养基一起和与抗-CD3抗体一起培养5天。然后,收集T细胞,并通过实时RT-PCR分析Foxp3的表达。图36显示了获得的结果。注意,在图36中,“培养基”表示其中没有培养细胞的培养基的结果,“GF”表示其中培养GF小鼠的IEC的条件培养基的结果,“Clost.”表示其中培养定殖梭菌属的小鼠的IEC的条件培养基的结果,和“Clost.+ α TGF β ”表示向其添加抗-TGF- β 抗体的条件培养基并且其中培养定殖梭菌属的小鼠的IEC的条件培养基的结果。同时,**表示“P<0.001”。

[0356] 如从图36中显示的结果明显的,当将从定殖梭菌属的小鼠获得的IEC的培养上清液添加到脾CD4⁺T细胞时,加速了向表达Foxp3的细胞的分化。同时,向Treg细胞的分化被抗-TGF- β 抗体抑制。

[0357] 此外,研究了MMP2、MMP9和MMP13的表达,认为它们有助于潜在TGF- β 的活化。还研

究了吲哚胺2,3-二氧化酶(IDO)的表达,认为其参与Treg细胞的诱导。具体地,将梭菌属的46个细菌菌株(Clost.)或乳杆菌属的3个细菌菌株(Lacto.)口服施用给C57BL/6无菌小鼠。施用后三周,收集IEC,并通过实时RT-PCR分析MMP2、MMP9、MMP13和IDO基因的相对mRNA表达水平(分析的小鼠的数目为每组三只)。图37至40显示了获得的结果。注意,在图37至40中,“GF#1至3”表示GF小鼠的结果,“Clost.#1至3”表示定殖梭菌属的小鼠的结果,和“Lacto.#1至3”表示定殖乳杆菌的小鼠的结果。

[0358] 有关潜在TGF- β 的活化和上述MMP之间的关系,参见D'Angelo等,J.Biol.Chem.276,11347-11353,2001;Heidinger等,Biol.Chem.387,69-78,2006;Yu等,Genes Dev.14,163-176,2000。有关IDO和Treg细胞的诱导之间的关系,参见G.Matteoli等,Gut 59,595(May,2010)。

[0359] 如从图37至39中显示的结果明显的,与上述TGF- β 的产生一致,编码MMP2、MMP 9和MMP13的基因的转录产物在由定殖梭菌属的小鼠获得的IEC中以比GF小鼠和定殖乳杆菌的小鼠中的那些更高的水平表达。

[0360] 此外,如从图40中显示的结果明显的,IDO仅在定殖梭菌属的小鼠中表达。

[0361] 因此,这揭示梭菌属活化IEC,并导致TGF- β 和其他诱导Treg细胞的分子在结肠中的产生。

[0362] (实施例11)

[0363] 接下来,研究了梭菌属定殖诱导的Treg细胞积累是否取决于病原体相关的分子模式识别受体的信号传播。具体地,检查了Myd88^{-/-}(Myd88(Toll-样受体的信号传导衔接物)缺陷的)、Rip2^{-/-}(Rip2(NOD受体衔接物)缺陷的)和Card9^{-/-}(Card9(Dectin-1信号传播的必需信号传播因子)缺陷的)SPF小鼠中的每一个的结肠固有层中Treg细胞的数目。另外,使梭菌属在Myd88^{-/-}GF小鼠中定殖,并检查Treg细胞的数目的变化。图17和18显示了获得的结果。如从图17和18中显示的结果明显的,具有病原体相关的分子模式识别受体的相关因子的缺陷的每种SPF小鼠的Treg细胞的数目相对于用作对照的同窝的野生型小鼠的数目没有变化。另外,还发现当梭菌属定殖于具有Myd88缺陷的GF小鼠时,诱导结肠固有层中Treg细胞的积累。因此,这表明诱导结肠固有层中Treg细胞的积累的机制不是依赖于主要病原体相关的分子模式的识别路径的激活,如大多数细菌所引起的那样,而是依赖于特定的共生细菌物种。

[0364] (实施例12)

[0365] 已知肠道Foxp3⁺ Treg细胞通过IL-10产生发挥一些免疫阻遏功能(参考非专利文献9)。同时,已知具有已从中特异地除去IL-10的CD4⁺Foxp3⁺细胞的动物发展炎性肠病(参考非专利文献18)。在这考虑,首先,检查了各种组织的淋巴细胞中IL-10的表达。具体地,从SPFI110^{venus}小鼠的各种组织分离淋巴细胞,并通过流式细胞术分析CD4的表达和Venus的表达。图19显示了获得的结果。注意,图19中的每个数值代表分成四个区域的相应区域内细胞的比例。

[0366] 此外,从I110^{venus}小鼠中分离结肠固有层中的淋巴细胞,并通过FACS检测细胞表面上的T细胞受体 β 链(TCR β)的表达。图20显示了获得的结果(当对CD4⁺细胞设置门控时获得的FACS点图)。注意,图20中的每个数值代表分成四个区域的相应区域内细胞的比例。

[0367] 而且从I110^{venus}小鼠中分离结肠固有层中的淋巴细胞。在Golgistop(BD

Bioscience) 存在下用PMA (50ng/ml) 和离子霉素 (1 μ g/ml) 刺激淋巴细胞四小时。然后,在给予刺激后,通过使用抗-IL-17PE抗体、抗-IL-4APC抗体 (11B11) 和抗-IFN- γ FITC抗体 (BD Bioscience) 根据cytofix/cytoperm试剂盒 (BD Bioscience) 的手册对胞内细胞因子进行染色。图21显示了获得的结果 (当对CD4⁺细胞设置门控时获得的FACS点图)。

[0368] 注意,图21中的每个数值代表分成四个区域的相应区域内细胞的比例。

[0369] 另外,从Foxp3^{eGFP}报告小鼠的脾 (Spl) 分离Foxp3⁺CD4⁺细胞和Foxp3⁻CD4⁺细胞,并且从I110^{venus}小鼠的结肠固有层和小肠 (SI) 固有层分离Venus⁺细胞。然后对获得的细胞进行关于预定基因的表达的分析。基因表达通过实时RT-PCR使用Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 和ABI 7300实时PCR系统 (Applied Biosystems) 进行分析。这里,每个细胞的值对GAPDH的量进行标准化。图22显示了获得的结果。注意,在图22中,误差棒代表标准偏差。

[0370] 如从图19至22中显示的结果明显的,在保持在SPF条件下的小鼠的颈部淋巴结 (外周淋巴结)、胸腺、外周血、肺和肝中几乎没有检测到Venus⁺细胞 (产生IL-10的细胞)。同时,在其脾、派尔集合淋巴结和肠系膜淋巴结中,轻微地检测到Venus⁺细胞 (参考图19)。另一方面,在小肠固有层和结肠固有层的淋巴细胞中发现许多Venus⁺细胞。另外,肠中的大多数Venus⁺细胞是CD4阳性的,并且还是T细胞受体 β 链 (TCR β) 阳性的 (参考图19和20)。此外,发现Venus⁺CD4⁺ T细胞表达Foxp3和其他Treg细胞相关的因子诸如细胞毒性T-淋巴细胞抗原 (CTLA-4) 和糖皮质激素诱导的TNFR-相关蛋白 (GITR), 尽管Venus⁺CD4⁺ T细胞不显示Th2 (产生IL-4的) 和Th17 (产生IL-17的) 表型中的任一个 (参考图21和22)。另外,显示肠道Venus⁺细胞中CTLA-4的表达水平高于从Foxp3^{eGFP}报告小鼠中分离的脾GFP⁺ Treg细胞中的表达水平 (参考图22)。

[0371] (实施例13)

[0372] Venus⁺细胞可以基于胞内Foxp3表达分类成至少两个亚组,即,Venus⁺ Foxp3⁺双阳性 (DP) Treg细胞和Venus⁺ Foxp3⁻ Treg细胞。后一亚组的细胞对应于1型调节性T细胞 (Tr1) (参考非专利文献8和9)。在这方面,对实施例8中观察到的Venus⁺细胞 (产生IL-10的细胞) 进行了关于Foxp3的表达的研究。具体地,通过FACS分析了保持在GF或SPF条件下的I110^{venus}小鼠的结肠固有层和小肠固有层中CD4、Foxp3和Venus的表达,并在SPF和GF I110^{venus}小鼠之间比较肠道固有层中Venus⁺细胞的数目。图23显示了获得的结果 (当对CD4⁺细胞设置门控时获得的点图)。

[0373] 另外,通过流式细胞术分析了SPF I110^{venus}小鼠的各种组织中的CD4细胞中Venus和Foxp3的胞内表达。图24显示了获得的结果 (当对CD4⁺细胞设置门控时获得的点图)。注意,图24中的每个数值代表分成四个区域的相应区域内细胞的比例。

[0374] 此外,为了研究共生细菌的存在是否对于胃肠道中调节性细胞中IL-10的表达具有任何影响,制备了无菌 (GF) I110^{venus}小鼠。然后,使预定种类的细菌定殖在获得的GF I110^{venus}小鼠中。定殖细菌物种之后三周,通过流式细胞术分析结肠和小肠中表达Foxp3和/或Venus的CD4⁺细胞群 (V⁺F⁻, Venus⁺Foxp3⁻细胞; V⁺F⁺, Venus⁺ Foxp3⁺细胞; 和V⁻F⁺, Venus⁻ Foxp3⁺细胞)。图25显示了当对结肠CD4⁺细胞设置门控时获得的点图,和图26和27显示了每个小鼠的CD4⁺细胞群中的比例。注意,图25中的每个数值代表分成四个区域的相应区域内细胞的比例。同时,图26和27中的误差棒代表标准偏差,*表示“P<0.02,”和**表示“P<

0.001”。

[0375] 此外,为了检查共生细菌的存在是否对于胃肠道中的调节性细胞中的IL-10表达具有任何影响,将抗生素随水一起口服给予每组五只或六只 I110^{venus} 小鼠持续10周。组合使用了以下抗生素。

[0376] 氨苄西林 (A;500mg/L Sigma)

[0377] 万古霉素 (V;500mg/L NACALAI TESQUE, INC.)

[0378] 甲硝哒唑 (M;1g/L NACALAI TESQUE, INC.)

[0379] 新霉素 (N;1g/L NACALAI TESQUE, INC.)

[0380] 然后,将结肠固有层、小肠固有层 (SI)、肠系膜淋巴结 (MLN) 和派尔集合淋巴结 (PP) 中的淋巴细胞的CD4和Foxp3用抗体染色,并通过FACS分析。结果获自两次或更多次独立实验,这些实验产生相似的结果。图28显示了获得的结果 (每个样品中CD4⁺细胞中的Venus⁺细胞的比例)。注意,图28中的每个白色圈代表个体样品,每个水平棒代表平均值,*表示“P<0.02”,和“AVMN”通过使用抗生素的首字母代表施用的抗生素的种类。

[0381] 如从图23和24中显示的结果明显的,显示小肠固有层中富含Venus⁺ Foxp3⁻细胞,即Tr1⁻样细胞,并且Venus⁺ Foxp3⁺ DP Treg细胞以高频率存在于SPF小鼠的结肠中 (参考图23和24)。相比之下,虽然也在其他组织中观察到了充足数目的Foxp3⁺细胞,但是几乎在所有这些细胞中都没有观察到Venus的表达 (参考图24)。

[0382] 另外,如从图23和25至28中显示的结果明显的,显示结肠中具有Venus⁺ Foxp3⁻、Venus⁺ Foxp3⁺和Venus⁻Foxp3⁺的所有调节性T细胞级分在GF条件下均显著降低 (图23和26至27)。此外,还在用抗生素治疗的SPF I110^{venus} 小鼠中观察到Venus⁺细胞的相似降低 (参考图28)。

[0383] 此外,如从图25至27中显示的结果明显的,梭菌属的定殖强烈诱导结肠中具有Venus⁺ Foxp3⁻、Venus⁺ Foxp3⁺和Venus⁻Foxp3⁺的所有调节性T细胞级分,并且其诱导程度等于SPF小鼠中的那些 (参考图25和27)。另外,发现乳杆菌的3个菌株的定殖或SFB的定殖对于结肠中Venus⁺和/或Foxp3⁺细胞的数目具有极小的影响 (参考图25和27)。此外,拟杆菌属的16个菌株的定殖也诱导Venus⁺细胞,但是定殖的影响是Venus⁺ Foxp3⁻ Tr1⁻样细胞特异的 (参考图25和27)。另一方面,发现测试的细菌物种中没有一个对小肠固有层中产生IL-10的细胞的数目发挥任何显著影响 (参考图26)。

[0384] 因此,显示结肠中定殖的梭菌属或由所述细菌获得的生理活性物质提供了诱导IL-10⁺调节性T细胞在结肠固有层中积累或IL-10在T细胞中表达的信号。同时,显示小肠中Venus⁺细胞的数目不受其中没有共生细菌存在或共生细菌减少的情形的显著影响 (参考图23和26至28),并且IL-10⁺调节性细胞 (Tr1⁻样细胞) 独立于共生细菌在小肠固有层中积累。

[0385] (实施例14)

[0386] 研究了梭菌属诱导的Venus⁺细胞是否具有与SPF小鼠的结肠中的Venus⁺细胞相似的免疫阻遏功能。具体地,将从脾分离的CD4⁺CD25⁻细胞 (效应T细胞, T_{eff}细胞) 以2×10⁴/孔接种到平底96-孔板,并与经受30Gy辐射照射处理的2×10⁴个脾CD11c⁺细胞 (抗原呈递细胞)、0.5μg/ml抗-CD3抗体和大量Treg细胞一起培养三天。另外,对于最后6个小时,培养CD4⁺CD25⁻细胞,向其中加入 [³H]-胸苷 (1μCi/孔)。注意,实施例14中使用的Treg细胞是从Foxp3^{eGFP}报告小鼠的脾分离的CD4⁺GFP⁺ T细胞或定殖梭菌属的GF I110^{venus} 小鼠或SPF

I110^{venus}小鼠的结肠固有层中的CD4⁺Venus⁺ T细胞。然后,基于 [³H]-胸苷的摄入量确定细胞的增殖,并通过每分钟的计数 (cpm) 值表示。

[0387] 如从图29中显示的结果明显的,其中定殖梭菌属的小鼠的Venus⁺CD4⁺细胞阻遏CD25-CD4⁺活化的T细胞的体外增殖。阻遏活性稍微优于从Foxp3^{eGFP}报告小鼠分离的GFP⁺细胞的阻遏活性,但是等于从SPF I110^{venus}小鼠分离的Venus⁺细胞的阻遏活性。因此,显示梭菌属诱导具有足够的免疫阻遏活性的表达IL-10的T细胞,并从而在维持结肠中的免疫稳态中起关键作用。

[0388] (实施例15)

[0389] 接下来,研究了大量梭菌属的定殖和所造成的Treg细胞的增殖对局部免疫反应的影响。

[0390] <葡聚糖硫酸酯钠 (DSS) 诱导的结肠炎模型>

[0391] 首先,如上所述制备DSS诱导的结肠炎模型,并研究梭菌属的接种和Treg细胞的增殖对模型小鼠的影响。具体地,将对照小鼠和接种梭菌属的小鼠用2%DSS处理,然后持续六天观察和测量体重损失、粪便硬度和出血,然后以数值评估。另外,在第6天,收集结肠、解剖和通过HE染色进行组织学分析。图41至43显示了获得的结果。注意,在图41至43中,“SPF+Clost.”或“SPF+Clost.#1至3”表示用定殖梭菌属的小鼠的粪便悬浮液接种并在常规环境中生长六周的C57BL/6小鼠的结果,并且“SPF”或“SPF#1至3”表示在常规环境中生长六周而没有接种粪便悬浮液的C57BL/6小鼠(对照小鼠)的结果。另外,在图41中,竖直轴“疾病评分”代表如上所述的疾病活性指数(DAI),和水平轴“2%DSS后(d)”代表向小鼠初始施用2%DSS后流逝的天数。此外,在图41中,*表示“P<0.02”,且**表示“P<0.001”。同时,已知调节性树突细胞诱导的Treg细胞在DSS诱导的结肠炎模型中起阻止作用(参见S.Manicassamy等, Science 329,849(8月13日,2010))。

[0392] 如从图41至43中显示的结果明显的,结肠炎的症状诸如体重损失和直肠出血在具有大量梭菌属的小鼠(下文还称为“梭菌属丰富的小鼠”)中与对照小鼠相比被显著阻遏(参见图41)。与梭菌属丰富的小鼠相比,在对照小鼠中显著观察到结肠炎症的所有典型特征,诸如结肠变短、水肿和出血(参见图42)。此外,组织学特征诸如粘膜糜烂、水肿、细胞浸润和隐窝小囊损失在DSS-处理的梭菌属丰富的小鼠中没有在对照小鼠中严重(参见图43)。

[0393] <噁唑酮诱导的结肠炎模型>

[0394] 接下来,如上所述制备噁唑酮诱导的结肠炎模型,并研究梭菌属的接种和Treg细胞的增殖对模型小鼠的影响。具体地,将对照小鼠和接种梭菌属的小鼠用噁唑酮敏化,并随后将其直肠内部用1%噁唑酮/50%乙醇溶液处理。然后,观察和测量体重损失。另外,解剖结肠,并通过HE染色进行组织学分析。图44和45显示了获得的结果。注意,在图44和45中,“SPF+Clost.”表示用定殖梭菌属的小鼠的粪便悬浮液接种并在常规环境中生长六周的C57BL/6小鼠(梭菌属丰富的小鼠)的结果,并且“SPF”表示在常规环境中生长六周而没有接种粪便悬浮液的C57BL/6小鼠(对照小鼠)的结果。另外,在图44中,竖直轴“重量(%初始)”代表施用1%噁唑酮后的体重,其中施用前的体重视为100%,并且水平轴“1%噁唑酮后(d)”代表向小鼠初始施用1%噁唑酮后流逝的天数。同时,已知Th2-型T细胞参与噁唑酮诱导的结肠炎。(参见M.Boirivant, I.J.Fuss, A.Chu, W.Strober, J Exp Med 188,1929(Nov 16,1998))。

[0395] 如从图44和45中显示的结果明显的,在对照小鼠中,结肠炎继续发展,伴有持续的体重损失。同时,梭菌属丰富的小鼠的体重损失降低(参见图44)。另外,还揭示梭菌属丰富的小鼠的结肠中具有组织学疾病诸如粘膜糜烂、水肿、细胞浸润和出血的部分减少(参见图45)。

[0396] (实施例16)

[0397] 接下来,研究了大量梭菌属的定殖和所造成的Treg细胞的增殖对全身免疫反应(系统IgE产生)的影响。具体地,如上所述,通过以2周间隔两次施用明矾吸附的卵清蛋白(OVA)免疫对照小鼠和接种梭菌属的小鼠。然后,从这些小鼠中收集血清,并通过ELISA研究其OVA-特异性IgE水平。另外,从每组的小鼠中收集脾细胞,并且研究由体外OVA再刺激造成的IL-4和IL-10产生。图46至48显示了获得的结果。注意,在图46至48中,“SPF+Clost.”表示用定殖梭菌属的小鼠的粪便悬浮液接种并在常规环境中生长的BALB/c SPF小鼠(梭菌属丰富的小鼠)的结果,“SPF”表示在常规环境中生长而没有接种粪便悬浮液的BALB/c SPF小鼠(对照小鼠)的结果,并且**表示“ $P < 0.001$ ”。同时,在图46中,竖直轴“OVA特异性IgE (ng/ml)”代表血清中OVA特异性IgE的浓度。此外,在图46中,水平轴代表向梭菌属丰富的小鼠或对照小鼠(4-周龄)初始施用明矾吸附的卵清蛋白后流逝的天数,和“OVA+Alum”表示施用明矾吸附的卵清蛋白的时间。另外,在图47和48中,水平轴上的“OVA”表示其中进行体外OVA再刺激的情形的结果,并且“-”表示其中没有进行体外OVA再刺激的情形的结果。此外,在图47和48中,竖直轴“IL-4 (pg/ml)”和“IL-10 (pg/ml)”分别显示脾细胞的培养上清液中IL-4浓度和IL-10浓度。

[0398] 如从图46至48中显示的结果明显的,IgE水平在梭菌属丰富的小鼠中显著低于对照小鼠(参见图46)。此外,与对照小鼠相比,用OVA和明矾敏化的梭菌属丰富的小鼠的脾细胞中由OVA再刺激造成的IL-4产生被降低(参见图47)并且从而IL-10产生增加(参见图48)。

[0399] 因此,组合考虑实施例15中显示的结果,这揭示结肠中梭菌属对Treg细胞的诱导在局部和全身免疫反应中起重要作用。

[0400] (实施例17)

[0401] 接下来,用属于IV簇的梭菌属的三个菌株(图49中列出的菌株22、23和32)定殖GF Balb/c。三周后,通过FACS分析结肠Foxp3⁺ Treg细胞。图50显示了获得的结果。如从图50中显示的结果明显的,定殖梭菌属的三个菌株的定菌小鼠显示在GF小鼠和接种所有46个菌株的小鼠之间的中等Treg诱导模式。

[0402] (实施例18)

[0403] 接下来,研究了从人获得的粪便样品的孢子形成(例如,氯仿抗性的)级分是否和从小鼠获得的粪便样品的孢子形成级分具有相似的诱导调节性T细胞的增殖或积累的效应。

[0404] 具体地,将来自健康志愿者(日本人,男性,29岁)的人粪使用磷酸缓冲盐水(PBS)悬浮,与氯仿(终浓度3%)混合,并且然后在振荡水浴中孵育60分钟。通过用氮气鼓泡蒸发氯仿后,将含有人肠道细菌的氯仿抗性(例如,孢子形成)级分的等份口服接种给无菌(GF)小鼠(IQI,8周龄)。将处理的小鼠在乙烯隔绝箱中保持3周。收集结肠,并纵向打开,洗涤以除去粪便内容物,并且在含有5mM EDTA的汉克氏平衡盐溶液(HBSS)中在37℃下振荡20分钟。除去上皮细胞和脂肪组织后,将结肠切成小片并与含有4%胎牛血清、1mg/ml胶原酶D、

0.5mg/ml分散酶和40μg/ml DNA酶I的RPMI1640(全部由Roche Diagnostics生产)在37℃下在振荡水浴中孵育1小时。消化的组织用含有5mM EDTA的HBSS洗涤,重悬于5ml 40% percoll(由GE Healthcare生产)并覆盖于15-ml Falcon管中的2.5ml 80% percoll上。通过在780g在25℃离心20min进行Percoll梯度分离。收集界面细胞并悬浮于含有PBS、2% FBS、2mM EDTA和0.09%NaN₃的染色缓冲液中并用藻红蛋白标记的抗-CD4Ab(RM4-5,由BD Biosciences生产)对表面CD4进行染色。Foxp3的胞内染色用Alexa647标记的抗-Foxp3 Ab(FJK-16S,由eBioscience生产)和Foxp3Staining Buffer Set(由eBioscience生产)进行。通过流式细胞术分析CD4阳性淋巴细胞群中Foxp3阳性细胞的百分比。图51和52显示了获得的结果。

[0405] 在图中,显示了来自GF小鼠(GF)或强饲氯仿处理的人类粪便(GF+Chloro.)的GF小鼠的CD4阳性淋巴细胞的Foxp3表达的直方图(图51)和合并数据(图52)。另外,图51中的数字表示门控中细胞的百分比。图52中的每个圈代表单独的动物,误差棒表示SD,并且**表示“P<0.001”。

[0406] 如从图51和52中显示的结果明显的,还发现当在GF小鼠中定殖人肠道细菌的孢子形成(例如,氯仿抗性的)级分时,诱导小鼠结肠固有层中Foxp3⁺调节性(Treg)细胞的积累。

[0407] 接下来,通过强饲氯仿处理的人粪便研究了有哪些物种的细菌生长。

[0408] 具体地,使用QIAamp DNA Stool mini kit(由QIAGEN生产),从如上所述的健康志愿者的人粪便(人粪便)或强饲氯仿处理的人类粪便的GF小鼠的粪便颗粒(GF+Chloro.)分离细菌基因组DNA。使用LightCycler 480(由Roche生产)进行定量PCR分析。相对量通过ΔCt方法计算并且对样品的总细菌量、稀释度和重量标准化。使用以下引物组:

[0409] 总细菌

[0410] 5'-GGTGAATACGTTCCCGG-3'(SEQ ID NO:62)和

[0411] 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO:63)

[0412] 梭菌XIVa簇(球形梭菌(*Clostridium coccoides*)亚组)

[0413] 5'-AAATGACGGTACCTGACTAA-3'(SEQ ID NO:64)和

[0414] 5'-CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA-3'(SEQ ID NO:65)

[0415] 梭菌IV簇(柔嫩梭菌(*Clostridium leptum*))

[0416] 5'-GCACAAGCAGTGGAGT-3'(SEQ ID NO:66)和

[0417] 5'-CTTCCTCCGTTTTGTCAA-3'(SEQ ID NO:67)

[0418] 拟杆菌属

[0419] 5'-GAGAGGAAGGTCCCCCAC-3'(SEQ ID NO:68)和

[0420] 5'-CGCTACTTGGCTGGTTCAG-3'(SEQ ID NO:69)。

[0421] 图53显示了获得的结果。

[0422] 如从图53中显示的结果明显的,与氯仿处理前的人粪便相比,强饲氯仿处理的人类粪便的小鼠展现出大量的孢子形成细菌,诸如梭菌XIVa簇和IV簇,和非孢子形成细菌诸如拟杆菌属的严重减少。

[0423] [工业实用性]

[0424] 如上所述,本发明通过利用属于梭菌属的细菌或由所述细菌获得的生理活性物质等使得可能提供诱导调节性T细胞(Treg细胞)的增殖或积累的优异组合物。因为本发明的

组合物具有免疫阻遏效应,所述组合物可用于,例如,预防或治疗自身免疫性疾病或变应性疾病,以及阻遏器官移植中的免疫排斥等。另外,健康个体可容易地且常规地摄取所述组合物作为食品或饮料,诸如健康食品,以提高其免疫功能。

[0425] [序列表]

[0426] SEQ ID NO:1至20,62至69

[0427] <223>人工合成的引物序列

[0428] SEQ ID NO:21至61

[0429] <223>每个梭菌属菌株的16S rRNA编码基因序列

序列表

<110> 东京大学
<120> 诱导调节性T细胞的增殖或积累的组合物
<130> 11B1040011
<150> JP2010/129134
<151> 2010-06-04
<150> PCT/JP2010/071746
<151> 2010-12-03
<160> 69
<170> PatentIn 3.1 版
<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 1
ggcaatagtt ccttcccaga gtt 23
<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 2
gggtcgcata ttgtggtact tg 22
<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 3
ccttttgtag ccctgctcac tct 23
<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 4
gggtcacctg tatggcttca g 21
<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 5
tcagtgaag atctgaagc a 21
<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 6
acaccggaag ccaaacaca 19
<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 7
gattttaata agtccaaga ccaaggt 27
<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 8
cttctatgca gttgatgaag atgtcaa 27
<210> 9
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 9
cctcgtcccg tagacaaaat g 21
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 10
tctccacttt gccactgcaa 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 11
ggacattgtc ttgatggca 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 12
cttgtcacgt ggtgtcactg 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 13
tctctggacg tcaaattgg 20
<210> 14
<211> 19

<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 14
gctgaacagc agagccttc 19
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 15
aggtctggat cactccaagg 20
<210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 16
tcgcctggac cataaagaa 19
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 17
agaggatgcg tgactttgtg 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 18
atacagcaga ccttctggca 20
<210> 19

<211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人工合成的引物序列
 <400> 19
 agagtttgat cmtggctcag 20
 <210> 20
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人工合成的引物序列
 <400> 20
 attaccgcgg ckgtg 16
 <210> 21
 <211> 1460
 <212> DNA
 <213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)
 <220>
 <221> rRNA
 <222> (1) .. (1460)
 <223> 梭菌菌株1的16S rRNA编码基因序列
 <400> 11
 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaaccatt ggatcgagga ttcgtccaag tgaaggtggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaaacagc cgctaatacc 180
 gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgtc agggacgaag caagtacgg tacctgacac 480
 ggctactacg gtcagcagcg cgtatacgta ggtgccagcg tatccggaat tacctgggtt 540
 aaggcgtgtt agccggactg cagtcagatg tgaatcacgg gctcaacttg tgctgcattg 600
 gaactgtagt tctgagtact gagagcagac ggaattctag gtagcgtga atgcgtagat 660
 ataggaggac acagtgcgag gcgtctgctg acagcaactg acgctgaggc gggaagcgtg 720
 ggggagccaa caggattaga tacctggtag ttcacgcctg gtaaacgat ggatactagg 780
 tgtgggggga ctgaccccct cgtggccgcc agttaacacc aataaagtat ccacactggg 840
 agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg cccgcacaag cggtggagta 900

tgtggttttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggg cttgacatcc cgaggaccgg 960
 actagagata gtcttttctc ttcggagacc tcggtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca 1020
 gctcgtgtcg taagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttgttagttg 1080
 ctacgcaaga gcactctagc gagactgccg ttgacaaaac ggaggaaggt ggggacgacg 1140
 tcaaatcatc atgcccctta tgtcctgggc cacacacgta ctacaatggg ggtcaacaga 1200
 gggaagcaat accgcgaggt ggagcaaadc ctaaaaagcc atcccagttc ggatcgcagg 1260
 ctgcaacccg cctgcgtgaa gttggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg 1320
 aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtcgg gaacaccgga 1380
 agtccgtagc ctaaccgcaa gggggggcgc ggccgaaggt gggttcgata attgggggtga 1440
 agtcgtaaca aggtagccgt 1460

<210> 22

<211> 1485

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1485)

<223> 梭菌菌株2的16S rRNA编码基因序列

<400> 22

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggccggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggaagggact gcttagtggtc ggacgggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc cttggagtgg ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac 180
 cgcataatat atctgggccg catggctctg gatatacaag atttatcgct ctgagatgga 240
 ctccgctctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg 300
 gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc 360
 agcagtgggg aatatgggc aatgggcgca agcctgacct agcaacgccg cgtgaaggaa 420
 gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttgt caggacgaa gcaagtacg gtacctgacg 480
 aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaac acgtaggtgg caagcggttat 540
 ccggatttac tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggactgc aagtcagatg tgaaaaccac 600
 gggctcaacc tgtgggcctg catttgaaac tgtagttctt gactactgga gaggcagacg 660
 gaattctagt ttagcgtga aatgcgtaga tatagaagaa cacagttgag gagccggtct 720
 gcaactgacg ctgagcgaga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 780
 acgctgtaaa cgatggatta ctaggtgttg ggggactgac cccctccgtg ccgcagttaa 840
 cacaataagt atcccacctg gggagtacga tcgcaaggtt gaaactcaaa aggaattgac 900
 gggggcccg cacaagcggtg gagtatgttg tttaaattcg aagcaacgcg aagaacctta 960
 ccagggcttg acatcccgtg gaccgtccta gagataggat tttcccttcg gggacactgg 1020
 agacagggtg tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgcg 1080
 acgagcgcaa cccttatgtg tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttga 1140
 caaacggag gaagggtggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggccaca 1200

cacgtactac aatggtggtc aacagaggga agcaaagccg cgaggtggag caaatcccta 1260
 aaagccatcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg gaatcgctag 1320
 taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgcccgtc 1380
 acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg ggcgcgggccg 1440
 aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1485

<210> 23

<211> 1491

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1491)

<223> 梭菌菌株3的16S rRNA编码基因序列

<400> 13

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcacctt cgaaagagac ttcggtcaat ggaaaagaat gcttagtggc ggacgggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc ctttcagtgg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcataacgt acgggtatcg catggtatct gtaccaaaga tttatcgctg agagatggcc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggtagggtaa cggcctacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgaaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgac ggggaagagc agaagacggt acctgtcgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatat gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgtagcc gggctgacaa gtcagatgtg aaatccgggg 600
 gctcaacccc cgaactgcat ttgaaactgt tggctttgag tatcggagag gcaggcggaa 660
 ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttagggggaa caccagtggc gaagcggcct 720
 gctggacgac aactgacggt gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
 tggtagtcca cgctgtaaac gatggatact aggtgtgcgg ggactgacct ctgcgtgccg 840
 cagctaacgc aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
 attgacgggg gcccgcacaa gcggtggatt atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa 960
 ccttaccagg gcttgacatc ctactaacga agtagagata cattaggtac ctttcggggg 1020
 aagtagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
 cccgcaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
 cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgccctt tatgtccttg 1200
 gctacacacg taatacaatg gcggtcaaca gagggatgca aaaccgcgag gtggagcgaa 1260
 cccctaaaag ccgtcccagt tcagatcgca gtctgcaacc cgactgcgtg aagtcggaat 1320
 cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
 cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtcgta gcctaaccgc aaggagggcg 1440
 cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

<210> 24
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)
 <220>
 <221> rRNA
 <222> (1) .. (1491)
 <223> 梭菌菌株4的16S rRNA编码基因序列
 <400> 24

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggtttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga 420
agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaaa tgacggtacc tgactaagaa 480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggag cgtagacggc agcgcaagtc tgagtgaat cccatggctt 600
aaccatggaa ctgctttgga aactgtgcag ctggagtga ggagagtaag cggaattcct 660
agtgtagcgt gaaatgcgta gattatagga ggaacaccag tggcgaaggc ggctaactga 720
actgtaactg acgttgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta 780
gtccacgccg taaacgatga ttactaggtg ttgggggacc aaggtcttcg gtgccggcgc 840
aaacgcatta agtaatccac ctggggagta cgttcgcaag aatgaaactc aaaggaattg 900
acggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt 960
acctgggtctt gacatcccgat tgacgagtga gcaaagtcac tttcccttcg gggcattgga 1020
gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tggttggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac ccctatttcc agtagccagc aggtagagct gggcactctg gagagactgc 1140
ccgggataac cgggaggaag gcggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgatcagg 1200
gctacacacg tgctacaatg gcgtaaacaa aggggaagcga gacggtgacg ttgagcaaat 1260
cccaaaaata acgtcccagt tcggattgta gtctgcaact cgactacatg aagctggaat 1320
cgctagtaat cgcaatcag aatgtcgcgg tgaatacgtt cccgggtctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgggagtc ggaaatgcc gaagtcagtg acctaaccga aaggaaggag 1440
ctgccgaagg tggagccggt aactggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491
  
```

<210> 25
 <211> 1467
 <212> DNA
 <213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)
 <220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1467)

<223> 梭菌菌株5的16S rRNA编码基因序列

<400> 25

```
agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagtgaaga tgctcgcatac tgaacttagt ggcggacggg tgagtaacac gtgagcaacc 120
tgcctttcag agggggatta cgtttggaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatcggag 180
tcgcatggca ctgatatcaa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
cagttggcgg ggtatcggcc caccaaaccg acaatcggta gccggactga gaggttgaac 300
ggccacattg ggactgagac gcggcccaga ctctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcgggttg 420
taaagttctg tcgcagggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgttg tccggaatta ctgggtgtaa 540
agggagcgta ggcgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagctgc 600
gttcaaactg ttcttcttga gtgaagtaga ggcaggcgga attcctagt tagcggtgaa 660
atgcgtagat attaggagga caccagtggc gaaggcgggc tgctgggctt tactgacgct 720
gaggctcgaa agcgtgggta gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgcggtaaac 780
gatgattact aggtgtgggt ggactgacct catccgtgcc ggagttaaca caataagtaa 840
tccacctggg gactacggcc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca 900
agcagtggag tatgtggttt aattcgacgc aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat 960
cgagtgcagg acatagagat atgtctttcc ttcgggacac gaagacaggt ggtgcatggt 1020
tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttacc 1080
attagttgct acgcaagagc actctaattg gactgccgtt gacaaaacgg aggaaggtgg 1140
ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcga cacacgtact acaatggcgg 1200
tcaacagagg gaggcaaagc cgcgaggcag agcaaacccc taaaagccgt ctcaattcgg 1260
attgcaggct gcaactcgcc tgcataagtg cggaattgct agtaatcgcg gatcagcatg 1320
ccgcgggtgaa tacgttcccc ggccttgtag acaccgcccc tcacaccatg agagccggta 1380
acaccgaag tcaatagtct aaccgcaagg aggacattgc cgaaggtggg attggttaatt 1440
ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgt 1467
```

<210> 26

<211> 1474

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1474)

<223> 梭菌菌株6的16S rRNA编码基因序列

<400> 26

```
agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
```

ggggtgtacgg gaaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
 gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
 gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
 tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
 agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt gggatgaaga 420
 gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacggtacct gaagaagaag 480
 ccccggttaa ctacgtgcc gacgccgcgt taatacgtag gggggcaagc gttatccgga 540
 tttactgggt gtaaaggggg cgagacggc gatgcaagcc aggagtgaag gcccgggccc 600
 caacccccgg actgctcttg ggaactgcgt ggctggagtg cagagggcag cggaattcct 660
 ggtgaaatgc gtagatatca gaagacacgg tgcgagggcg cctgctgact gactgacgt 720
 tgagccgaag cgtggggagc aaacaggatt agatacctg gtagtcacgc cgtaaagcat 780
 gattactagg tgtcggggag cagagactgc ccggtgccg agccaacgca ttaagtaatc 840
 cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaag ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag 900
 cgggtggagca tgtggtttta ttcgaagcaa cgcaagaac cttacctggt cttgacatcc 960
 cgatgacgag tgagcaaagt cactttccct tcggggcatt ggagacaggt ggtgcatggt 1020
 tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aaccctatt 1080
 tccagtagcc agcaggtaga gctgggcact ctggagagac tgcccgggat aaccgggagg 1140
 aaggcgggga tgacgtcaaa tcattcatgcc cttatgatc agggctacac acgtgctaca 1200
 atggcgtaaa caaagggaag cgagacggtg acgttaagca aatccccaaa ataacgtccc 1260
 agttcggatt gtagtctgca actcgactac atgaagctgg aatcgctagt aatcgcaat 1320
 cagaatgtcg cggatgaatac gttcccggtt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga 1380
 gtcggaaatg cccgaagtca gtgacctaac cgaaaggaa gagctgccga aggtggagcc 1440
 ggtaactggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgt 1474

<210> 27

<211> 1484

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1484)

<223> 梭菌菌株7的16S rRNA编码基因序列

<400> 27

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaatccag tgaaggagtt ttcggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaacagc cgctaatacc 180
 gcatgatgcg tctgggaggc atctctcttg acgcccaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagcttggt ggccgggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360

gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggattttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca tttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtg tagcggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gagcggattg 720
ctggacagta ctgacgctga agcgcgaaag cgtgggagca aacagataga tacctggtag 780
tcacgcgtaa acgatggata ctaggtgtgg ggggactgac cccctccgtg ccgcagctaa 840
cgcaataagt atcccacctg gggagtagca tcgcaagggtt gaaactcaaa ggaattgacg 900
ggggcccgca caagcgggtg agtatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
aggccttgac atcctgctaa cgaaccagag atggattagg tgcccttcgg ggaaagcaga 1020
gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa 1080
cgagcgcaac cttattgtt agttgctacg caagagcact ctagcgagac tgccgttgac 1140
aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcacatgcc cttacgtcc tgggccacac 1200
acgtactaca atggcggcc acaaagagag gcaagaccgc gaggtggagc aaatctcaaa 1260
aagccgtccc agttcggatc gcaggctgca acccgctgc gtgaagttgg aatcgctagt 1320
aatcgcggat cagcatgccg cggtaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca 1380
caccatgaga gtcgggaaca cccgaagtcc gtagcctaac cgcaaggggg gcgcggccga 1440
aggtgggttc gataattggg gtgaagtcgt aacaagtag ccgt 1484

<210> 28

<211> 1483

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1483)

<223> 梭菌菌株8的16S rRNA编码基因序列

<400> 28

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cgccccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcctttgag tgtcggagag gtaatcggga 660

ttccttgtgt agcgggtgaat gcgtagatat agagaccaca gtgccgacgc cgaataactga 720
 cgatactgac ggtgagcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggttagtc 780
 cacgctgtaa acgatcgata ctaggtgtgc ggggactgac ccctgcgtgc cggagttaac 840
 acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaagggtg aaactcaaag gaattgacgg 900
 gggcccgcac aagcgggtgga ttatgtgggt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca 960
 gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg gaaagcagag 1020
 acaggtgggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac 1080
 gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact gccgttgaca 1140
 aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct gggctacaca 1200
 cgtaatacaa tggcggttaa caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg aacccccaaa 1260
 agccgtccca gttcggatcg caggtgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga atcgctagta 1320
 atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggce ttgtacacac cgcccgtcac 1380
 accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg cgcggccgaa 1440
 ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1483

<210> 29

<211> 1480

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1480)

<223> 梭菌菌株9的16S rRNA编码基因序列

<400> 29

ggagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
 agaacctgcc gtatactggg ggataaact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
 acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgctctgat 240
 tagctgggtg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggt 300
 gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
 tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
 tatgtaaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
 actaagaagc cccgggctaa ctacgtgcca gcagccgcg taatacgtag gggcaagcgt 540
 tatccggatt tactgggtgt aaagggggcg cagacggcga tgcaagccag gagtgaagc 600
 cggggcccaa ccccgggact gctcttggac tgcgtggctg gagtgcagag ggcagcgaat 660
 tcctgtgtag cgtgaatgcg tagattcaga ggacacgtgc gagcgctgc tgactgcact 720
 gacgtgagcc cgaagcgtgg ggagcaaca ggattagata cctggtagtc cacgccgtaa 780
 acgatgatta ctaggtgtcg gggagcagag actgcccgtt gccgcagcca acgcattaag 840
 taatccacct ggggagtagc ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc 900
 acaagcgggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggccttga 960

catccccctg gatggcccggt aacgggggtca gccttttcggg gcagggggaga caggtggtgc 1020
 atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcacag agcgcaaccc 1080
 ctgcccgcag tagccagcat tttagatggg gactctgcgg ggactgccgg ggacaacccg 1140
 gaggaaggcg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat ggcctgggct acacacgtgc 1200
 tacaatggcg cgcacagagg gaggcgaagc ggcgacgcgg agcgaacccc aaaaacggcg 1260
 tcccagttcg gattgtagtc tgcaaccgga ctacatgaag ccggaatcgc tagtaatcgc 1320
 ggatcagaat gccgcggtga atacgttccc gggctttgta cacaccgccc gtcacaccat 1380
 gggagccggg aatgcccga gttctgtgacc gaaccgtaa ggggaggggc agccgaaggc 1440
 aggcccggtg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1480

<210> 30

<211> 1489

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1489)

<223> 梭菌菌株10的16S rRNA编码基因序列

<400> 30

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgagc 60
 gaagcacttt tttagaactc ttcggaggga agagagggtg acttagcggc ggacgggtga 120
 gtaacgcgtg ggcaacctgc cttacacagg gggataacaa ttagaaatga ttgctaatac 180
 cgcataagac cacggctactg catggtacag tggtaaaaac tgaggtggtg taagatgggc 240
 ccgcgtctga ttaggtagtt ggtggggtag aagcctacca agccgacgat cagtagccga 300
 cctgagaggg cgaccggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagtgagg 420
 aagtattttc gtatgtaaag ctctatcagc aggggaagaa atgacggtac ctgactaaga 480
 agcccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcaa gcgttatccg 540
 gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gacttgcaag tctgatgtga aaatccgggg 600
 cccaacccgg gactgcattg aaactgtatt ttttgagggt gtccgaggag gcaagtggaa 660
 tcctgggtag cggtgaaatg gcgtagaatt caggaggaa caccagtggc ggaaggcgaa 720
 ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aagcgtggga gcaaacaaga attagatacc 780
 ctggtagtca cgctgtaacg atcgatacta ggtgtgcggg gactgacccc tgcgtgccgg 840
 agttaacaca ataagtatcg cactggggag tacgatcgca aggttgaaac tcaaaggaat 900
 tgacgggggc ccgcacaagc ggtggattat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
 ttaccagggc ttgacatcct gctaacgaag tagagataca ttaggtgccc ttcggggaaa 1020
 gcagagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc 1080
 cgcaacgagc gcaacccta ttgttagttg ctacgcaaga gcactctagc gagactgccg 1140
 ttgacaaaac ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgtcctgggc 1200
 tacacacgta atacaatggc ggttaacaaa gggatgcaaa gccgcgaggc agagcgaacc 1260

ccaaaaagcc gtcccagttc ggatcgcagg ctgcaacccg cctgcgtgaa gtcggaatcg 1320
ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgagagtcgg gaacacccga agtccgtagc ctaaccgcaa ggagggcgcg 1440
gccgaagggtg gggttcgataa ttgggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

<210> 31

<211> 1490

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1490)

<223> 梭菌菌株11的16S rRNA编码基因序列

<400> 31

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttcggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctcttg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa agggccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgacca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg gggtgtaaac ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggatttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca tttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtggt gtagcggtag aatgcgtaga ttataccgga ggaaccacca gtggcggaag 720
gcggattgct ggaacagtaa ctgacgctga ggcgccgaaa gcgtggggag caaacaggat 780
agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tggatactaa gtgtggggga ctgaccctt 840
cgtgcccagc taagcaataa gtttcccacc tggggagtag gatcgcaggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggccccgc caagcgggtg gagtaggggt taattggagc aacgggaaga 960
accttaccag ggcttgacat cctgtaacga accagaagag ggattaggtg ctttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt gggtaaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt attgttagtt gctacgcaag agcactctag cgagactgcc 1140
gttgacaaaa cgaggaagg tggggacgac gtcaaatcat catgcccctt acgtcctggg 1200
ccacacacgt actacaatgg cggccaacaa agagaggcaa gaccgcgagg tggagaaaat 1260
ctcaaaaagc cgtcccagtt cggatcgcag gctgcaaccc gcctgcgtga agttggaatc 1320
gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc 1380
ccgtcacacc atgagagtcg ggaacacccg aagtccgtag cctaaccgca aggggggcgc 1440
ggccgaagggt gggttcgata attgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1490

<210> 32

<211> 1489

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1489)

<223> 梭菌菌株12的16S rRNA编码基因序列

<400> 32

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
agaacctgcc gtatactggg ggataaacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggt 300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaaggagcgc tagacggcag cgcaagtctg aagtgaaatc 600
ccatggctta accatggaac tgctttggaa actgtgcagc tggagtgcag gagaggtaa 660
cggaattcct agtgtagcgg tgaatgcgta gatattagag gacaccagtg gcgatgcggc 720
ttactggact gtactgacgt tgagctcgaa agcgtgggga gcaccagaat tagaatactg 780
tagtcacgcc gtaaccgatg atactaggtg tgggggacca aggtctcgtg ccggcggcaa 840
acgcattaag taatccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac 900
ggggacccgc acaagcgggtg gagcatgtgg tttaatcga agcaacgcga agaaccttac 960
ctggctcttga catcccgatg acgagtgagc aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga 1020
caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080
agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg gcactctgga gagactgccc 1140
gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatacgc atgcccctta tgatcagggc 1200
tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaattc 1260
caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg 1320
ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc 1380
cgtcacacca tgggagtcgg aaatgccga agtcagtgc ctaaccgaaa ggaaggagct 1440
gccgaagggtg gagccggtaa ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgt 1489

```

<210> 33

<211> 1456

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1456)

<223> 梭菌菌株13的16S rRNA编码基因序列

<400> 33

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gaagcacttg agaacgattc ttcggatgag gacttttgtg actgagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg ggtaacctgc cctatacagg gggataacag ttagaaatga ctgctaatac 180
cgcataagcg cactaaaacc gcatggttcg gtgtgaaaaa ctgaggtggg ataggatgga 240
cccgcgtctg attagcttgt tgggtgggta acggctcacc aaggcgacga tcagtagccg 300
gcctgagagg gcgaccggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc 360
agcagtgggg gatattgcac aatgggggga accctgatgc agcgacgccg cgtgggtgaa 420
gaagcgcctc ggcgcgtaaa gccctgtcag cagggaagaa aatgacggtg cctgaagaag 480
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatagc taggggcaag cgttattccg 540
ggatttactg ggtgtaaagg gggcgacagc ggcgatgcaa gccaggagtg aagccccggg 600
cccacccggg actgctcttg gactgcgtgc tggagtgcag aaggggcagc gatcctgtgt 660
accgtgaatt gcgtagatat cagagacacg ttgcgagcgc tgctgactgc actgacgtga 720
gcgaagctgg agcacagata gatactgtag tcagcgtaac gatgatacta gtgtcgggag 780
cagagactgc ccgttgcggc agcccaacgc attagtattc cacttgggga gtacgtttcg 840
cagaatgaac ttcaaggaaa tgacggggac ccgcacaagg cgggtggagca tgtggtttaa 900
ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccaggc cttgacatcc cccctggatg gcccgtaacg 960
gggtcagcct ttcggggcag gggagacagg tgggtcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt 1020
gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctgc ccgcagtagc cagcatttta 1080
gatggggact ctgcggggac tgccggggac aaccggagg aaggcgggga tgacgtcaaa 1140
tcacatgcc ccttatggcc tgggctacac acgtgctaca atggcgccga cagagggagg 1200
cgaagcggcg acgcggagcg aacccccaaa acggcgtccc agttcggatt gtagtctgca 1260
acccgactac atgaagccgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac 1320
gttcccgggt cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gccgggaatg cccgaagtct 1380
gtgaccgaac ccgtaagggg aggggcagcc gaaggcaggc tcggtgactg gggatgaagtc 1440
gtaacaaggt agccgt 1456

```

<210> 34

<211> 1475

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1475)

<223> 梭菌菌株14的16S rRNA编码基因序列

<400> 34

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120

```

gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaag ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
 gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcgaa 660
 tttccttgat tagcggtgaa tgcgtagata taaggaagga cacagtggcg agcggattac 720
 tggacgatac tgacgtgagc gcgaaagcgt gggggagcaa cagaaattag atactgtagt 780
 gcagctgtaa cgatcgatac tagttgcggg actgaccctt tgcgtgcgag ttacacaata 840
 agtatcgcac ctgggagtag gatcgcaagg ttggaactca aaggaattga cggggcccg 900
 acaagcgttg gattatgtgg ttttaattcg agcaacgcga agaaccttac cagggttga 960
 catcctgcta acgaagtaga gatacattag gtgcccttcg gggaaagtag agacaggtgg 1020
 tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 1080
 cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga ctgccgttga caaacggag 1140
 gaaggcgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc ctgggctaca cacgtaatac 1200
 aatggcgggt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag cgaaccccaa aaagccgtcc 1260
 cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga 1320
 tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg cctgttacac accgcccgtc acaccatgag 1380
 agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag ggcgcgcccg aaggtgggtt 1440
 cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1475

<210> 35

<211> 1480

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1480)

<223> 梭菌菌株15的16S rRNA编码基因序列

<400> 35

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
 agaacctgcc gtatactggg ggataaacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
 acagcttcgc atgaagcagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
 tagctgggtg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggt 300
 gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
 tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga agtatttcgg 420

tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
 actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg ggcaagcggt 540
 atccggattt actgggtgta aaggagcgt agacggcagc gcaagtctga agtgaaatcc 600
 catggcttaa cccatggaac tgctttggaa actgtgcagc tggagtgcag gagaggtaag 660
 cggaattcct agtgtagcgt gaaatgcgta gattattagg aggacaacag tgcgagcgct 720
 actgacgtga ggctcgaagc gtgggagcaa acaggattag atacctggta gtcacgcgta 780
 aacgatgatt actagggtgt tgggggacca aggtcttcgg tgccggcgca aacgcattaa 840
 gtaatccacc tggggagtag gttcgcgaaga atgaaactca aaggaattga cggggacccg 900
 cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgcg aagaacctta cctggtcttg 960
 acatcccgat gacgagttag caaagtcact ttcccttcgg ggcatggag acagggtggtg 1020
 catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc 1080
 cctattttcca gtagccagca ggtagagctg ggcactctgg agagactgcc cgggataacc 1140
 gggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgatcagg ctacacacgt 1200
 gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag acggtgacgt taagcaaate ccaaaaataa 1260
 cgtccagtt cggtatttag tctgcaactc gactacatga agctggaate gctagtaate 1320
 gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc 1380
 atgggagtcg gaaatgccc aagtcagtga cctaaccgaa aggaaggagc tgccgaaggt 1440
 ggagccggt actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1480

<210> 36

<211> 1486

<212> DNA

<213> 溶纸莎草梭菌(*Clostridium papyrosolvens*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1486)

<223> 梭菌菌株16的16S rRNA编码基因序列

<400> 36

agagtttgat cctggctcag gataaacgct ggcggcgcac ataagacatg caagtcgaac 60
 ggacttaact cattctttta gattgagagc ggtagtggtg ggactggtga gtaacacgta 120
 agcaacctgc ctatcagagg ggaataacag tgagaaatca ttgctaatac cgcatatgct 180
 cacagtatca catgatacag tgaggaaagg agcaatccgc tgatagatgg gcttgcgctt 240
 gattagttag ttggtgggt aacggcctac caagacgacg atcagtagcc ggactgagag 300
 gttgaacggc cacattggga ctgagatacg gccagactc ctacgggagg cagcagtcgg 360
 gaatattgag caatggagga aactctgacg cagtgcgcgc gcgtatagga agaaggtttt 420
 cggattgtaa actattgtcg ttagggaaga taaaagactg tacctaagga ggaagccccg 480
 gctaactatg tgccagcagc cgcggttaata catagggggc aagcgttatc cggaattatt 540
 ggggtgtaaag ggtgcgtaga cggaagaaca agttggttgt gaaatccctc ggctcaactg 600
 aggaactgca accaaaacta ttctccttga gtgtcggaga ggaaagtgga attcctagtg 660
 tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg cgaaggcgac tttctggacg 720

ataactgacg ttgaggcacg aaagtgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc 780
 cacactgtaa acgatggata ctaggtgtag ggtgtattaa gcactctgtg ccgccgctaa 840
 cgcattaagt atcccacctg gggagtacga ccgcaagggt gaaactcaaa ggaattgacg 900
 ggggccccga caagcagtgg agtatgtggg ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 960
 agggtttgac atataccgga atatactaga gatagtatag tccttcggga ctggtataca 1020
 ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag 1080
 cgcaaccctc atcgttagtt gctagcaggt aatgctgaga actctagcga gactgccggt 1140
 gataaatcgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccctttatg tcctgggcta 1200
 cacacgtact acaatggccg taacagaggg aagcaatata gtgatatgga gcaaaaccct 1260
 aaaagcggtc tcagttcgga ttgaaggctg aaattcgcct tcatgaagcc ggaattgcta 1320
 gtaatggcag gtcagcatac tgccgtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt 1380
 cacaccatga gatttgaaa taccgaagc ctgtgagcta actgtaaaga ggcagcagtc 1440
 gaaggtagag ccaatgattg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccgt 1486

<210> 37

<211> 1493

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1493)

<223> 梭菌菌株17的16S rRNA编码基因序列

<400> 37

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaaccaac ggattgagga ttcgtccaaa tgaagttggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
 gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggcaa cgccccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggacgaac aaatgacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtaggtggca agcgttatcc 540
 ggattttatt ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg 600
 gctcaaccca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcgga 660
 ttccgtgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt 720
 gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacaggg attagatacc 780
 ctggtagtca cgccgtaaac gatggatact aggtgtgggg ggactgaccc cctccgtgcc 840
 gcagctaacg caataagtat cccacctggg gactacgac gcaagggttg aaactcaaag 900
 gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gtatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
 aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaaccagaga tggatcaggt gcccttcggg 1020

gaaagcagag acaggtgggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
 gtcccccaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140
 gccgttgaca aaacggagga aggtggggac gacgtcaaat catcatgccc cttacgtcct 1200
 gggccacaca cgtactacaa tggcggccaa caaagagagg caagaccgcg aggtggagca 1260
 aatctcaaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagttgga 1320
 atcgctagta atcgcgatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
 cgccccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctgacc gcaagggggg 1440
 cgcgggccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtagta acaaggtagc cgt 1493

<210> 38

<211> 1493

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1493)

<223> 梭菌菌株18的16S rRNA编码基因序列

<400> 38

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcttata tttcagaagt tttcggatgg acgagagata agcttagtg cggacgggtg 120
 agtaacacgt gagcaacctg cctttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata 180
 ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg 240
 ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc 300
 cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 360
 gcagcagtgg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg 420
 aagacggtct tcggattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg taccctaaaga 480
 ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtacggagc gagcgttgct 540
 cggaattact ggggtgtaaag ggagcgtacg cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc 600
 ggcttaactg gtagctgcgt tcaaaacttc ttgtcttgag tgaagtagag gcaggcggaa 660
 ttcctagtgt agcgggtgaaa tgcgtagata taggaggaca ccagtgggagc aagccgcctg 720
 ctgggcttta actgacgctg aggtcgtgaaa gcgtggggag caaaccagga ttagataccc 780
 tggtagtcaa cgctgtaaac gatgattact aggtgtgggg gggactgacc ccctccgtgc 840
 cgcagttaac acaataagta tccacctggg gactacggcc gcaaagtttg aaaactcaaa 900
 aggaatgacg ggggcccgcg caaagcagtg gactatgttg tttaatttcg aagcaacgcg 960
 aagaacctta ccaggtcttg acatcgtgcg catagcctag agataggtga agcccttcgg 1020
 ggcgcacaga caggtgggtg atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
 tcccgcacag agcgcaaccc ttattattag ttgctacgca agagcactct aatgagactg 1140
 ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg 1200
 ggctacacac gtactacaat ggcaactgaaa cagagggaag cgacatcgcg aggtgaagcg 1260
 aatccccaaaa aagtgtccca gttcggattg caggctgcaa ctcgcctgca tgaagtcgga 1320

attgctagta atcgcggtac agcatgccgc ggtgaatacg ttccccgggcc ttgtacacac 1380
 cgccccgtcac accatgggag tcggtaacac ccgaagccag tagcctaacc gcaaggagg 1440
 cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 39

<211> 1483

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1483)

<223> 梭菌菌株19的16S rRNA编码基因序列

<400> 39

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggagtgaaga tgcttgcata tgaacttagt ggcgacggg tgagtaacac gtgagcaacc 120
 tgcctttcag agggggataa cgtttgaaa cgaacgctaa taccgcataa aatateggag 180
 tcgcatggca ctgatatcaa aggagcaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
 cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggtg gccggactga gaggttgaac 300
 ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt gggggatatt 360
 gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcggttg 420
 taaagttctg tcgcaggga cgaatgac ggtaccctgc aagaaagctc cggctaacta 480
 cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgtt tccggaatta ctgggtgtaa 540
 agggagcgta ggcgggagga taaagttgaa tgtgaaatct atgggctcaa cccatagctg 600
 cgttcaaaac tgttcttctt gagtgaagta gaggcaggcg gaattcctag tgtagcgggtg 660
 aaatgcgtag atattaggag gaacaccagt ggcgaaagcg gcctgctggg cttttactga 720
 cgctgaggct cgaaagcgtg ggtagcaaac agaattagat taccctgtta ttcacggcgg 780
 taaacgatga ttactagggt tgggttgacc tgaccccat tcgtgccgga agtaacacca 840
 taaagtaatc cacctggggg agtacggccg ccaggttgaa acttcaaaag gaattgacgg 900
 gggcccgcac aagcagtgga ggtatgtggt ttaatttcga cgcaaacgcg aagaacctta 960
 ccagggtctt gacatcgagt gacggacata gagatatgtc tttcctttcg ggacacgaag 1020
 acagggtgtg catggttgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac 1080
 gagcgcaacc cttaccatta gttgctacgc aagagcactc tgatgggact gccgttgaca 1140
 aaacggagga aggtggggat gacgtcaa atcatgccc cttatgacct gggcgacaca 1200
 cgtactacaa tggcgggtcaa cagagggagg caaagccgag aggcagagca aaccctaaa 1260
 agccgtctca gttcggattg caggtgcaa ctcgcctgca tgaagtcgga attgctagta 1320
 atcgcggtac agcatgccgc ggtgaatacg ttccccgggcc ttgtacacac cgccccgtcac 1380
 accatgagag ccggtaacac ccgaagtcga tagtctaacc gcaaggagga cattgccgaa 1440
 ggtgggattg gtaattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1483

<210> 40

<211> 1511

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1511)

<223> 梭菌菌株20的16S rRNA编码基因序列

<400> 40

```

agagttttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gggctcatat tgaaacctag tgatgtatga gttagtggcg gacgggtgag taacgcgtgg 120
agaacctgcc gtatactggg ggataaacact tagaaatagg tgctaatacc gcataagcgc 180
acagcttcgc atgaaacagt gtgaaaaact ccggtggtat acgatggatc cgcgtctgat 240
tagctggttg gcggggtaac agcccaccaa ggcgacgac agtagccggc ctgagagggt 300
gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa 360
tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccg tgagtgaaga agtatttcgg 420
tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaat actgacctta cggtcagcag acggtacctg 480
actaagaagc cccggctaac tacgtgccag cagcccggt aatacgtagg ggcaagcgtt 540
atccggattt actgggtgta aaggagcgt agacggcagc gcaagtctga gtgaaatccc 600
atggcttaac catggaactg ctttggaac tgtgcagctg gtagtcagga gaggtaaagc 660
ggaattccta gtgtagcggg tgaaatgcgt agatatagga ggaacaacag tggcgaagg 720
cggctactgg gactgtaact gacgttgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
ataccctggg agtcacgccg taaacgatga ttactaggtg ttgggggacc ataggtcttc 840
ggtgccggcg caaacgcaat taagtaatcc acctggggga gtacgttcgc aagaatgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaaagc 960
aaacgcgaag aaaccttacc tggctctgac atcccgatga cgagttagca aagtcacttt 1020
cccttcgggg caattggaga caggtggtgc atgggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat 1080
gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cctatttcca gtagccagca ggtagagctg 1140
ggcactctgg agagactgcc cgggataacc gggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat 1200
catgccccctt atgatcaggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag 1260
acggtgacgt taagcaaatc ccaaaaataa cgtcccagtt cggattgtag tctgcaactc 1320
gattacatga agctggaatc gctagtaatc gcgaatcaga atgtcgcggt gaatacgttc 1380
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccg aagtcagtga 1440
cctaaccgaa aggaaggagc tgccgaaggt ggagccggtg actggggtga agtagataac 1500
aaggtagccg t 1511

```

<210> 41

<211> 1495

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1495)

<223> 梭菌菌株21的16S rRNA编码基因序列

<400> 41

```
agagtttgat cctgcgctca ggacgaacgc tggcggcgcg cctaacacat gcaagtcgaa 60
cgggactatt ttgggagaag ttttcggatg gatctcggga tagtttagtg gcggacgggt 120
gagtaacgcg tgggcaacct gccttacaca gggggataac aattagaaat gattgctaata 180
accgcataag accacgggtac tgcattggtac agtggtataaa actgaggtgg tgtaagatgg 240
gcccgcgtct gattaggttag ttggtgggggt agaagcctac caagccgacg atcagtagcc 300
gacctgagag ggcgaccggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg 360
cagcagtggg gaatatgtga caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgagtga 420
ggaagtatgtt cggtatgtaa agctctatca gcagggaaga aaatgacggg acctgactaa 480
gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtagggggca agcgttatcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggacttgcaa gtctgatgtg aaaatccggg 600
ggcccaaccc cggaactgca ttggaaactg tatatctaga gtgtcggaga ggcaagtgga 660
atttcctggg ttagcgggtg aatgcgtaga tatcagagga acaccagtgg cgaaggcgct 720
tgcctgacga tgactgacgt tgaagctcga aaagcgtggg tagcaaacag aattagatac 780
cctggtaagt caaccgggta aacgatgatt actaggtttt ggttggactg accccatccg 840
tgccggagta acaccaataa gttatccaac ctgggaagta cggccggcag gttgaaactc 900
aaaaggaaat gacggggggc cgcaacaagca gttgaagtat gtgggttaat tcgacgcaa 960
cgcaagaac cttaccaggt cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt 1020
cgggacacga agacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
aagtcgca acgagcgcaa cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctgatggga 1140
ctgccgttga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac 1200
ctgggcgaca cacgtactac aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag 1260
caaaccctta aaagccgtct cagttcggat tgcaggctgc aactcgctg catgaagtgc 1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttccggg ccttgtagac 1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaac accgaagtc aatagtctaa ccgcaaggag 1440
gacattgccg aaggtgggat tggttaattg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495
```

<210> 42

<211> 1491

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1491)

<223> 梭菌菌株22的16S rRNA编码基因序列

<400> 42

```
agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac 60
gagaatccag tgaaggagtt ttcggacaac ggatctggag gaaagtggcg gacgggtgag 120
```

```

taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggt tggaaacagc cgctaatacc 180
gcatgatgcg tctgggaggc atctctctgg acgccaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
tcgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa aggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaag ttcttttctg agggacgaag aaagtgacgg tacctcagga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggattttatt ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaaagca agtcagatgt gaaaactcag 600
ggctcaaccc tgagcctgca tttgaaactg tttttcttga gtgctggaga ggcaatcgga 660
attccgtgtg tagcggtgaa atgcgtagat atacggagga caccagtggc gaagcggatt 720
gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 780
ggtagtccac gccgtaaacg atggatacta ggtgtggggg gactgacccc ctccgtgccg 840
cagctaacgc aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgcaaaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa 960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ctttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
cccgaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
cgttgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgcccct tacgtcctgg 1200
gccacacacg tactacaatg gcggccaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa 1260
tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc cgcctgcgtg aagttggaat 1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggggggcg 1440
cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

<210> 43

<211> 1495

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1495)

<223> 梭菌菌株23的16S rRNA编码基因序列

<400> 43

```

agagtttgat cctgtgcctc aggatgaacg ctggcggcgt gcttaacaca tgcaagtcga 60
acgagaacca acgattgag gattcgtcca aatgaagttg gggaaagtgg cggacgggtg 120
agtaacgcgt gagcaatctg ccttggagtg gggaataacg gttggaaca gccgctaata 180
ccgcatgatg cgtctgggag gcattctctt ggacgcaaaa gatttatcgc tctgagatga 240
gctcgcgtct gattagctag ttggcggggc aacggccac caaggcgacg atcagtagcc 300
ggactgagag gttggccggc cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg 360
cagcagtggg gaatatggg caatgggcgc aagcctgacc cagcaacgcc gcgtgaagga 420

```

agaaggcttt cgggttgtaa acttctttta agggggacga acaaatgacg gtacccttg 480
 aataagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtg caagcggtat 540
 ccggatttat tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggaatgc aagtcagatg tgaaaactat 600
 gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcgg 660
 aattccgtgt gtagcgggtga aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
 attgctggac agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
 cccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actaagtgtg gggggactga cccctccgt 840
 gccgcagcta acgcaataag tatcccacct ggggagtagc atcgcaaggt tgaaactcaa 900
 aggaattgac gggggcccg cacaagcgggtg gagtatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
 agaaccttac cagggttga catctgcta acgaaccaga gatggatcag gtgcccttcg 1020
 gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
 aagtcccgca acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
 ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc 1200
 ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc aacaaagaga ggcaagaccg cgaggtggag 1260
 caaatctcaa aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg cttgttacac 1380
 accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac accgaagtc cgtagcctga ccgcaagggg 1440
 ggcgcgcccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

<210> 44

<211> 1440

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1440)

<223> 梭菌菌株24的16S rRNA编码基因序列

<400> 44

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcacgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggagtgaaga tgctcgcata tgaacttagt ggcgacggg tgagtaacac gtgagcaacc 120
 tgcctttcag agggggataa cgtttgaaa cgaacgctaa taccgcataa aatatcgag 180
 tcgcatggca ctgatatcaa aggagtaatc cgctgaaaga tgggctcgcg tccgattagg 240
 cagttggcgg ggtaacggcc caccaaaccg acaatcggtg gccggactga gaggttgaac 300
 ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt ggggatatt 360
 gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgat gccgcgtgaa tgaagacggc cttcggttg 420
 taaagttctg tcgcaggga cgaaaatgac ggtaccctgc aagaaagtc cggtacta 480
 cgtgccagca gccgcggtta tacgtaggga gcaagcgtt tccggaatta ctgggtgtaa 540
 agggagcgta ggcgggagga taagttgaat gtgaaatcta tgggctcaac ccatagttgc 600
 gttcaaaact gttcttcttg agtgaagtag aggcaggcgg aattcctagt gtagcgggtg 660
 aatgcgtaga tattagagga acaccagtgg cgaagcggcc tgctgggctt ttactgacgc 720

tgagctcgaa agcgtgggta gcaacaggat tagataccct ggtagtccac gcggtaaacg 780
 atgattacta gtgtgggtgg actgacccat ccatgccgga gttaacacaa tagtaatcca 840
 cctggggagt acgcgcagtg aactcaaagg attgacgggg cccgcacaag cagtgagtat 900
 gtggtttatt cgacgcacgc gagactacag tcttgacatc gatgacggac tagagatatg 960
 tctttctcgg acacgaagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt 1020
 tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct taccattagt tgttacgcaa gagcactcta 1080
 atgggactgc cgttgacaaa acggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgccctt 1140
 tatgacctgg gcgacacacg tactacaatg gcggtcaaca gagggaggca aagccgcgag 1200
 gcagagcaaaa cccctaaaag ccgtctcagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgcatg 1260
 aagtcggaat tgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1320
 gtacacaccg cccgtcacac catgagagcc ggtaacaccc gaagtcaata gtctaaccgc 1380
 aaggaggaca ttgccgaagg tgggatggta attggggtga agtagtaaca aggtagccgt 1440

<210> 45

<211> 1495

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1495)

<223> 梭菌菌株25的16S rRNA编码基因序列

<400> 45

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaaccatt ggatcgagga ttctccaag tgaaggtggg gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaacagc cgctaatacc 180
 gcatgataca gctgggaggc atctccctgg ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cggccaccca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttgtc agggacgaag caagtacgg tacctgacga 480
 ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagtggca agcgttatcc 540
 ggatttattg ggggtgtaaag ggcgtgtagg cgggaatgca agtcagatgt gaaaactatg 600
 gggctcaacc catagcctgc atttgaaact gtatttcttg agtgctggag aggcaatcga 660
 attccgtgtg tagcgggtga aatgcgtaga tatacggagg aacaccagtg gcgaagcgga 720
 ttgctggaca agtaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
 ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actaggtgtg gggggactga cccctccgt 840
 gccgcagcta acgcaataag tatccacact ggggagtacg atcgcaaggt tgaaactcaa 900
 aggaattgac gggggcccg cacaagcgtg gagtatgtgg ttttaattcga cgcaacgcga 960
 agaaccttac cagggttga catcctacta acgaaccaga gatggattag gtgcccttcg 1020
 gggaaagtag agacaggtgg tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080

aagtcgca acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
 ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttacgtc 1200
 ctgggccaca cacgtactac aatggcggcc aacaaagaga ggcaaagccg cgaggtggag 1260
 caaatctcaa aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagttg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttccggg ccttgtacac 1380
 accgcccgtc acaccatgag agtcgggaac accgaagtc cgtagcctaa ccgcaagggg 1440
 ggcgcgccg aaggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495

<210> 46

<211> 1495

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌(*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1495)

<223> 梭菌菌株26的16S rRNA编码基因序列

<400> 46

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcgcgctgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcgatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
 gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag ggtaatcgga 660
 attcctttgt gtagcggtag aatgcgtaga tataagaaga acaccagtgg cgaaggcgga 720
 ttactggacg ataactgacg gtgaggcgcg aaagcgtggg ggagcaacag attaaatacc 780
 ctggtagtcc acgctgttaa cgatcgatac taggtgtgcc gggactgacc ccctgcgtgc 840
 ccggagttaa ccacaataag tatcgacact ggggagtagc atcgcaaggt gaacttcaa 900
 ggaattgacg ggggcccgc ccaagccgtg gattatgtgg ttaattcgaa gcaacgcgaa 960
 gaacctaccc agggcttgac atcctgctaa cgaagtagag atacattagg tgccctttcg 1020
 gggaaagcag agacaggtgg tgcattggtt tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
 aagtcgca acgagcgcaa cccctattgt tagttgctac gcaagagcac tctagcgaga 1140
 ctgccgttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgtc 1200
 ctgggctaca cacgtaatac aatggcgggt aacaaaggga tgcaaagccg cgaggcagag 1260
 cgaaccccaa aaagccgtcc cagttcggat cgcaggctgc aaccgcctg cgtgaagtcg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttccggg ccttgtacac 1380

accgccccgtc acaccatgag agtcgggaac acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag 1440
 ggccgccccg aagggtgggtt cgataattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1495
 <210> 47
 <211> 1509
 <212> DNA
 <213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)
 <220>
 <221> rRNA
 <222> (1) .. (1509)
 <223> 梭菌菌株27的16S rRNA编码基因序列
 <400> 47
 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggccggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagtacccc tgaaggagtt ttcggacaac tgatgggact acttagtggc ggacgggtga 120
 gtaacgcgtg agtaacctgc cttggagtgg ggaataacag ctggaaacag ctgctaatac 180
 cgcataatat gtctgtgtcg catggcactg gacatcaaag atttatcgct ctgagatgga 240
 ctcgcgtctg attagctagt tggcggggta acggcccacc aaggcgacga tcagtagccg 300
 gactgagagg ttggccggcc acattgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc 360
 agcagtgggg aatatgggc aatgggcgca agcctgacct agcaacgccg cgtgaaggaa 420
 gaaggctttc gggttgtaaa cttcttttaa gggggaagag cagaagacgg tacccttga 480
 ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttgct 540
 cggatttact gggtgtaaaagg ggcgtgcagc cggagagaca agtcagatgt gaaatccacg 600
 ggctcaaccc gtgaactgca ttgaaactg tttcctggag ttcggagggt atggaattct 660
 tgtttagcggg gaaatgctgt agatatggga gaaccaccag tgcgaggggg cttccgggac 720
 tgtacttgac tgtagaggtc tcaaagctgg gggagcaccg aggaatgaga taccgtgata 780
 gtccacgcg gtaacggatg attactaggt gttgggggga ccaggctct ttcggtgccg 840
 ggccgaaacc ctttaggaat tccacctggg gaattacgtt tggcaagaaa ggaacttcaa 900
 agaaattgaa cgggggaccc cccaaccgg tggaggcatg gtgttttatt tcggaggaa 960
 gggaagaacc ttaccttgt tctgacctc cggatgacga agtgagcaaa gtcaacttcc 1020
 cttcggggcc atggaggaca ggtggtggca tggttggtcg tcagctcgtg tcgtgagatg 1080
 ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag gtagagctgg 1140
 gcaactctga gagactgccc gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg tcaaatcatc 1200
 atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag ggaagcgaga 1260
 cggtgacgtt aagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt ctgcaactcg 1320
 actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc 1380
 cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aatgcccga agtcagtac 1440
 ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaaggtg gagccggtaa ctgggggtgaa gtcgtaacaa 1500
 ggtagccgt 1509
 <210> 48
 <211> 1583

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1583)

<223> 梭菌菌株28的16S rRNA编码基因序列

<400> 48

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagcttata tttcagaagt tttcggatgg acgagagata agcttagtgg cggacgggtg 120
agtaacacgt gagcaacctg cctttcagag ggggataaca gttggaaacg actgctaata 180
ccgcataacg ctgcgatggg gcatcccgat gcagccaaag gagcaatccg ctgaaagatg 240
ggctcgcggc cgattagcta gttggtgggg caacggccca ccaaggcgac gatcggtagc 300
cggactgaga ggttgatcgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag 360
gcagcagtgg gggatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcgacgc cgcgtgaggg 420
aagacggtct tcgattgta aacctctgtc tttggggaag aaaatgacgg tacccaaaga 480
ggaagctccg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggggag cgagcgttgt 540
ccggaattac tgggtgtaaa gggagcgtag cgggcgagaa agttgaatgt taaatctacc 600
ggcttaactg gtagctgcgt ccaaaacttc ttggtcttga gtgaaagtaa gaggccaggg 660
cggaaattct tagtctaagc gggtgaaaat gcgttagata ttagggagga accaccaggt 720
gggcgaaggg cggcttgctg ggctttaact ggacggctgg aggcttgga aaggcgtggg 780
gagagcaaac acaggaatt aagtataccc tggtatatgt cacacgcttg taaagagtat 840
gattaactta ggggtggtggg gggaacttga ccctttcgtg tgcgcgcagg ttaacacaca 900
tttagagtat atccaacttg gggagagtac ggccggcaaa gtttgaaact tcaaaaggga 960
aattgagacc ggggggcccc gccaccaagc acagtggaga gtatggtggg ttaattttcg 1020
agaagcaacc ggcggaagag aaactttacc agtccttgac atcggtggcg gcataagccc 1080
tagagattag gtgaagccct tcgggggccc caccagacag gtggtgcatg gttgtcgtca 1140
gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc ccgcaaacga gcgcaaccct tattattagt 1200
ttgctacgca agagcactct aatgagactg ccgttgacaa aacggaggaa ggtggggatg 1260
acgtcaaata atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtactacaat ggcactgaaa 1320
cagagggaag cgacatcgcg aggtgaagcg aatcccaaaa aagtgtccca gttcggattg 1380
caggctgcaa ctcgcctgca tgaagtcgga attgctagta atcgcggatc agcatgccgc 1440
ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgggag tcggtaacac 1500
ccgaagccag tagcctaacc gcaaggaggg cgctgtcgaa ggtgggattg atgactgggg 1560
tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1583

```

<210> 49

<211> 1519

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1519)

<223> 梭菌菌株29的16S rRNA编码基因序列

<400> 49

```

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg gaaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgct gggtgaagaa 420
gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaaagaaa tgacggtacc tgaagaagaa 480
gccccgggct aactacgtgc cagcagccgg cggtaatatt gtaggggggc aggcgttatt 540
cggatttact gggtggtaaa ggggggcgca aacggcgatg gcaggccagg aatggaaagc 600
ccggggggccc aaccccgga cttgctcttg ggaaactggc ttggctggga gtggcaggag 660
gggcaggcgg aaattcctgg tggtagcggg ggaaaatggc taaaaatcaa gaagaaaaac 720
cgggtggggaa aggcggcctg gtgggactgc gaactgacgt tgaaggcccg aaagcgtggg 780
gaacaaacag gatagattcc ctggtagttc cagccgtaa acgatgatta ctaggtgtcg 840
gggagcagag actgcccggg gccgcagcca acgcattaag taatccacct ggggagtacg 900
ttcgcaagaa tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgttg 960
tttaattcga agcaacgcga agaacttac ctggtcttga catcccgatg acgagtgagc 1020
aaagtcactt tcccttcggg gcattggaga cagggtgtgc atggttgtcg tcagctcgtg 1080
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgaacg agcgcaaccc ctatttccag tagccagcag 1140
gtagagctgg gcactctgga gagactgccc gggataaccg ggaggaaggc ggggatgacg 1200
tcaaatcatc atgcccctta tgatcagggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaga 1260
ggaagcgaga cggtgacgtt aagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggattgtagt 1320
ctgcaactcg actacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggtg 1380
aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcgg aaatgcccga 1440
agtcagtgac ctaaccgaaa ggaaggagct gccgaagggt gagccggtaa ctgggggtgaa 1500
gtcgtaacaa ggtagccgt 1519

```

<210> 50

<211> 1497

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1497)

<223> 梭菌菌株30的16S rRNA编码基因序列

<400> 50

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggggtatata agcgggaagtt tacggatgga aggttatata cttagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctgcc ccgtgccggg ggataccgcc tggaaacagg cgctaatacc 180
 gcataagcgc atacagccgc atgggtgtat gcggaaagct ccggcggcac gggatgggcc 240
 cgcgcccgat tagccagttg gcggggtaac ggcccaccaa agcgacgatc ggtagccggc 300
 ctgagagggc ggacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag 360
 cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag caacgccgcg tgggtgaagg 420
 agcgtttcgg cgcgtaaagc cctgtcagcg gggaagaaga aagacggtag ccgaccaaga 480
 agccccggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggggcgag cgttatccgg 540
 aattactggg tgtaaaggga gcgtagacgg cgaggtaagc ctgaagtgga agcccgcggc 600
 ccaaccgcgg aactgctttg ggaactgttt tgctggagta tgggaggggt aagcggaatt 660
 cctggtgtag cggtgaaatg cgtagatata aggaggaaca ccggtggcga aggcggctta 720
 ctggaccata actgacgttg aggtcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct 780
 ggtagtccac gcgtaaacga tgattaccag gtgtcgggtg tcgaaggacg gcccgggtgc 840
 gcagcgaacg cagtaagtaa tccacctggg gactacgttc gcaagaatga aactcaaagg 900
 aattgacggg gacccgcaca agcgggtggg catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga 960
 accttaccgg gccttgacat cccctggaca gcatatgtaa tgtatgtttc cttcgggacc 1020
 agggagacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggtcaagtcc 1080
 cgcaacgagc gcaaccctg cccccagtag ccagcattta agatgggcac tctgggggga 1140
 ctgccgggga taaccgggag gaaggcgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatggc 1200
 cggggctaca cacgtgctac aatggcgtaa acagagggag gcgagacagc gatgttaagc 1260
 gaaccccaaa aataacgtcc cagttcggtat tgcagcctgc aactcggctg catgaagctg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagaatgcc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac 1380
 accgcccgtc acaccatggg agtcgggaac gccgaagcc ggtgaccgaa cccgaaaggg 1440
 gaggagccgt cgaaggcggg cctggtgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgt 1497

<210> 51

<211> 1475

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1475)

<223> 梭菌菌株31的16S rRNA编码基因序列

<400> 51

gagtttgatc ctggctcagg ataaacgctg gcggcgacaa taagacatgc aagtcgaacg 60
 aacttaatac cttgcttgca aggttaagcgg ttagtggcgg actggtgagt aacacgtaag 120
 aaatctgcct atcagagggg aataacagtg agaaatcact gctaataccg catatgcat 180
 agttatcgca tgataatagt gggaaagaag caattcgctg atagatgagc ttgcggctga 240
 ttagctagtt ggtggggtaa cggcctacca aggcgacgat cagtagccgg cctgagaggg 300

tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtgggga 360
 atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgacgccgc gtgagtgaag aagtatttcg 420
 gtatgtaaag ctctatcagc agggaagaaa atgacggtag ctgactaaga aagccccggc 480
 taactacgtg ccagcagccg cggtaatagc tagggggcaa gcgttatccg gatttactgg 540
 tgtaaaggga gcgtagacgg cagcgcaagt ctgagtgaag tcccatggct taccatgaa 600
 actgcttttg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcggaatcc tagttagcgc 660
 gttgaaatgc gtagattatc agaaggaaca ccggtggccg aggcgccctg ctgggctttt 720
 actgacgctg aggctcgaag cgtgggtagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 780
 cggtaaacga tgattactag gtgtgggtgg actgacccca tccgtgccgg agttaacaca 840
 ataagtaatc cacctgggga gtacggccgc aagggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 900
 cccgcacaag cagtggagta tgtggtttta ttcgacgcaa cgcaagaac cttaccaggt 960
 cttgacatcg agtgacggac atagagatat gtctttcctt cgggacacga agacaggtgg 1020
 tgcattggtg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa 1080
 cccttaccat tagttgctac gcaagagcac tctaattgga ctgccgttga caaacggag 1140
 gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggcgaca cacgtactac 1200
 aatggcggtc aacagaggga ggcaaagccg cgaggcagag caaaccccta aaagccgtct 1260
 cagttcggat tgcaggctgc aactcgctc catgaagtc gaattgctag taatcgcgga 1320
 tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtagac accgcccgtc acaccatgag 1380
 agccggtaac acccgaagtc aatagtctaa ccgcaaggag gacattgccg aaggtgggat 1440
 tggtaattgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgt 1475

<210> 52

<211> 1491

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1491)

<223> 梭菌菌株32的16S rRNA编码基因序列

<400> 52

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 gagaatcagt ggattgagga ttcgtccaaa tgaaactgag gaaagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtga gcaatctgcc ttggagtggg gaataacggc tggaacagc cgctaatacc 180
 gcatgataca gttgggaggc atctctctga ctgtcaaaga tttatcgctc tgagatgagc 240
 tcgcgtctga ttagctagtt ggcggggtaa cgccccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atgggcgcaa gcctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttctg ggggacgaac aatgacggt accccaggaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatag gtaggtggca agcgttatcc 540
 ggatttattg ggtgtaaagg gcgtgtaggc gggaatgcaa gtcagatgtg aaaactatgg 600

gctcaaccca tagcctgcat ttgaaactgt atttcttgag tgctggagag gcaatcggaa 660
 ttccgtgtgt agcgggtgaaa tgcgtagata tacggaggaa caccagtggc gaagcggatt 720
 gctggacagt aactgacgct gaggcgcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
 tggtagtcca cgccgtaacg atggatacta gtgtgggggg actgaccccc tccgtgccgc 840
 agctaacgca ataagtatcc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
 attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagt atgtggttta attcgaagca acggaagaa 960
 ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga accagagatg gattaggtgc ccttcgggga 1020
 aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
 cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
 cggtgacaaa acggagggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgcccct tacgtcctgg 1200
 gccacacacg tactacaatg gcggttaaca aagagaggca agaccgcgag gtggagcaaa 1260
 tctcaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc cgctgcgtg aagttggaat 1320
 cgctagtaat cgcgatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
 cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggggggcg 1440
 cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

<210> 53

<211> 1495

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1495)

<223> 梭菌菌株33的16S rRNA编码基因序列

<400> 53

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggggtgtacgg ggaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
 gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
 gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctacaaaa gcgacgatca gtagccggcc 300
 tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
 agtgggggat attgcacaat ggggggaacc ctgatgcagc gacgccgcgt ggggtgaagaa 420
 gcgcctcggc gcgtaaagcc ctgtcagcag ggaagaaaat gacggtacct gaagaagaag 480
 ccccggttaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag ggggcaagcg ttatccggat 540
 ttactgggtg taaagggggc gcagacggcg atgcaagcca ggagtgaag cccggggccc 600
 aaccccgga ctgctcttgg aactgcgtgg ctggagtgca ggaggggcag gcggaattcc 660
 tgggttagcg gtgaaatgcg tagatatcag aggaacaccg gtggcgaaag cggcctgctg 720
 gactgcaact gacgttgagg cccgaaagcg gtgggagcaa acaggattag ataccctggt 780
 agtccacgcc gtaaacgatg attactaggt gtcggggagc agagactgcc cggtgccgca 840
 gccaacgca ttaagtatcc acctggggag tacgttcgca agaataaac tcaaaggaat 900

tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
 ttaccaggcc ttgacatccc cctggatggc ccgtaacggg gccagccctt tttgggcagg 1020
 ggagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg 1080
 caacgagcgc aacccctgcc cgcagtagcc agcattttag atggggactc tgcggggact 1140
 gccggggaca acccggagga aggcggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatggcct 1200
 gggctacaca cgtgctacaa tggcgccgac agagggagga gaagcggcga cgcggagcga 1260
 accccaaaaa cggcgtccca gttcggattg tagtctgcaa cccgactaca tgaagccgga 1320
 atcgctagta atcgcgatc agaatgccgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac 1380
 cgcccgctcac accatgggag ccgggaatgc ccgaagtctg tgaccgaacc cgtaagggga 1440
 ggggcagccg aaggcaggcc cggtgactgg ggtgaagtgc taacaaggta gccgt 1495

<210> 54

<211> 1493

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1493)

<223> 梭菌菌株34的16S rRNA编码基因序列

<400> 54

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtgct ggactggtga 120
 gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
 cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
 tcgcgtctga tttgttagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
 actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
 gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
 aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
 taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
 ggatttactg ggtgtaaagg gcgtcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
 gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcgga 660
 ttcccttgtgt agcgggtgaaa tgcgtagata taaggaagaa caccagtggc gaaggcggat 720
 tactggacga taactgacgg tgaggcgcca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
 ctggtagtcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgct gggactgacc ccctgcgtgc 840
 cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaaggttg aaactcaaag 900
 gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
 aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg 1020
 gaaagcagag acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
 gtcccgaac gagcgcaacc cctattgtta gttgtacgc aagagcactc tagcgagact 1140
 gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct 1200

gggctacaca cgtaatacaa tggcgggttaa caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg 1260
 aacccccaaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga 1320
 atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
 cgccccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg 1440
 cgcgggccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

<210> 55

<211> 1498

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1498)

<223> 梭菌菌株35的16S rRNA编码基因序列

<400> 55

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggggtgtacag aagggaagat tacggtcgga aggtctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
 taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
 gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
 gcgtctgatt attttttttg tcagggtaac ggcctaccaa agcgacgatc agtagccggc 300
 ctgagagggc ggacggccac actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag 360
 cagtggggga tattgcacaa tggggggaac cctgatgcag cgacgccgcg tgggtgaaga 420
 agcgccctcg cgcgtaaagc cctgtcagca gggaagaaaa tgacggtacc tgaagaagaa 480
 gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta aggggcaagc gttatccgga 540
 ttctactgggt gtaaaggggg cgacagggc gatgcaagcc aggagtgaag gcccggggcc 600
 caacccccgg actgctcttg ggaactgcgg tggctggagt gcaggagggg caggccggaa 660
 ttcttggtgt agcggtgaaa tgcgtagata tcaggaggaa caccggtggc gaaggcggcc 720
 tgctggactg caactgacgt tgaggcccga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
 ctggtagtca cgccgtaaag gatgattact aggtgtcggg gagcagagac tgcccgtgac 840
 cgagaccaac gattaagta atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag 900
 gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
 aaccttacca ggccttgaca tccccctgga tggcccgtaa cggggtcagc ctttcggggc 1020
 aggggagaca ggtggtgcat ggttgctcgc agctcgtgac gtgagatgtt ggggttaagtc 1080
 ccgcaacgag cgcaaccctt gcccgcagta gccagcattt tagatgggga ctctgcgggg 1140
 actgccgggg acaaccggga ggaaggcggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatgg 1200
 cctgggctac acacgtgcta caatggcgcc gacagaggga ggcgaagcgg cgacgcggag 1260
 cgaaccccaa aaacggcgct ccagttcgga ttgtagtctg caaccgact acatgaagcc 1320
 ggaatcgcta gtaatcgcg atcagaatgc cgcggtgaat acgttcccgg gtcttgtaca 1380
 caccgcccgt cacaccatgg gagccgggaa tgcccgaagt ctgtgaccga acccgtaagg 1440
 ggaggggcag ccgaaggcag gcccggtgac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgt 1498

- <210> 56
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)
 <220>
 <221> rRNA
 <222> (1) .. (1491)
 <223> 梭菌菌株36的16S rRNA编码基因序列
 <400> 56

```

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggaagc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcgccta tgaaggagat ttcggtcaac ggaataggct gcttagtggc tgacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctttcagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcataacac ataggtgtcg catggcattt atgtcaaaga tttatcgctg aaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tagccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag agggaagagc agaagacggt acctcttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagtggcaa gcgttgtccg 540
gatttactgg gtgtaaaggg cgtgtagccg ggctgacagt cagatgtgaa attccggggc 600
tcaaccccgg acctgcattt gaaactgttg gtcttgagta tcggagaggc aggcggaatt 660
cctagtgtag cggtgaaatg cgtagatatt aggaggaaca ccagtggcga aggcggcctg 720
ctggacgaca actgacgggtg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct 780
ggtagtccac gctgtaaacg atggatacta ggtgtgcggg gactgacccc ctgcgtgccg 840
cagttaacac aataagtatc ccacctgggg agtacgatcg caaggttgaa actcaaagga 900
attgacgggg gcccgacaaa gcggtggatt atgtggttta attcgatgca acgcgaagaa 960
ccttaccagg gcttgacatc ctgctaacga ggtagagata cgtcagggtg ccttcgggga 1020
aagcagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
cccgaacga gcgcaaccct tattgttagt tgctacgcaa gagcactcta gcgagactgc 1140
cggtgacaaa acggaggaag gtggggacga cgtcaaatca tcatgccctt tatgtcctgg 1200
gctacacacg taatacaatg gcggtaaaca gagggatgca atactgcgaa gtggagcgaa 1260
cccctaaaag ccgtcccagt tcagattgca gtctgcaact cgactgcatg aagtcggaat 1320
cgctagtaat cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg 1380
cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta gcctaaccgc aaggaggcg 1440
cggccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac aaggtagccg t 1491

```

- <210> 57
 <211> 1493
 <212> DNA
 <213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)
 <220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1493)

<223> 梭菌菌株37的16S rRNA编码基因序列

<400> 57

```
agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gggtgtacgg ggaggaaggc ttcggccgga aaacctgtgc atgagtggcg gacgggtgag 120
taacgcgtgg gcaacctggc ctgtacaggg ggataacact tagaaatagg tgctaatacc 180
gcataacggg ggaagccgca tggcttttcc ctgaaaactc cgggtgtaca ggatgggccc 240
gcgtctgatt agccagttgg cagggtaacg gcctaccaa gcgacgatca gtagccggcc 300
tgagagggcg gacggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 360
agtgggggat attgcacaat ggggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg tgagtgaaga 420
agtatttcgg tatgtaaagc tctatcagca gggaagaaa tgacggtacc tgactaagaa 480
gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc gttatccgga 540
tttactgggt gtaaaggag cgtagacggc agcgcaagtc tgaagtgaat tcccatggct 600
taaccatgga actgctttgg aaactgtgca gctggagtgc aggagaggta agcggaattc 660
ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa ggcggcttac 720
tggtactgtac tgacgttgag gctcgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg 780
tagtccacgc cgtaaagcat gattactagg tgttggggga ccaaggtctt cggtgccggc 840
gcaaacgcat taagtaatcc acctggggag tacgttcgca agaataaaac tcaaaggaat 900
tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc 960
ttacctggtc ttgacatccc gatgacgagt gagcaaagtc actttccctt cggggcattg 1020
gagacagggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc 1080
aacgagcgca acccctatct ccagtagcca gcaggtagag ctgggcactc tggagagact 1140
gccccgggata accgggagga aggcggggat gacgtcaaat catcatgccc cttatgatca 1200
gggctacaca cgtgctacaa tggcgtaaac aaagggaagc gagacggtga cgttgagcaa 1260
atccccaaaa taacgtccca gttcggattg tagtctgcaa ctcgactaca tgaagctgga 1320
atcgctagta atcgcgaaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggtc ttgtacacac 1380
cgcccgtcac accatgggag tcggaaatgc ccgaagtcag tgacctaac gaaaggaagg 1440
agctgccgaa ggtggagccg gtaactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493
```

<210> 58

<211> 1493

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1493)

<223> 梭菌菌株38的16S rRNA编码基因序列

<400> 58

```
aaagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
```

```

ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggctttcg ggttgtaaac ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagtggcaa gcgttgtccg 540
gatttactgg gtgtaaaggg cgtgcagccg gagagacaag tcagatgtga aatccacggg 600
ctcaacctgt gaactgcatt tgaaactgtt tcccttgagt gtcggagagg taatcggaat 660
tccttggtga gcggtgaaat gcgtagatat aaggaagaac accagtggcg aaggcggatt 720
actggacgat aaactgacgg tgaggcgca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
ctggtagtcc acgctgtaaa cgatcgatac taggtgtgcg gggactgacc ccctgcgtgc 840
cggagttaac acaataagta tcgcacctgg ggagtacgat cgcaaggttg aaactcaaag 900
gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga ttatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca gggcttgaca tcctgctaac gaagtagaga tacattaggt gcccttcggg 1020
gaaagtagag acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa 1080
gtcccgaac gagcgcaacc cctattgtta gttgctacgc aagagcactc tagcgagact 1140
gccgttgaca aaacggagga aggcggggac gacgtcaaat catcatgccc cttatgtcct 1200
gggctacaca cgtaatacaa tggcgggtta caaagggatg caaagccgcg aggcagagcg 1260
aacccccaaa agccgtccca gttcggatcg caggctgcaa cccgcctgcg tgaagtcgga 1320
atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac 1380
cgcccgtcac accatgagag tcgggaacac ccgaagtccg tagcctaacc gcaaggaggg 1440
cgcggccgaa ggtgggttcg ataattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1493

```

<210> 59

<211> 1511

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1511)

<223> 梭菌菌株39的16S rRNA编码基因序列

<400> 59

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
ggagcacccc tgaaggagtt ttcggacaac ggatgggaat gcttagtggc ggactggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc cttccagagg gggacaacag ttggaaacga ctgctaatac 180
cgcatgatgc gttggagccg catgactccg acgtcaaaga tttatcgctg gaagatggcc 240
tcgcgtctga ttagctagtt ggtgaggtaa cggcccacca aggcgacgat cagtagccgg 300
actgagaggt tggccggcca cattgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca 360

```

gcagtgggga atattgggca atggacgcaa gtctgaccca gcaacgccgc gtgaaggaag 420
aaggcttttcg ggttgtaaag ttcttttaag ggggaagagc agaagacggt accccttgaa 480
taagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttgtcc 540
ggatttactg ggtgtaaagg gcgtgcagcc ggagagacaa gtcagatgtg aaatccacgg 600
gctcaacccg tgaactgcat ttgaaactgt ttcccttgag tgtcggagag gtaatcgaa 660
ttccttggtg agcgggtgaaa tgcgtagata taaggaagac accagtggcg aagcggatta 720
ctggacgata actgacgggtg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagatacctg 780
ggtagtcaac gctgtaaagc atcgatacta ggtggtgcgg gggacttgac cccctgccgt 840
tgccggagtt aacaccaata aagtattcgg caccctgggg agtacgatcg caaagggttg 900
aaactcaaaa gaaatggacg gggggccccg cccaagcgg gtgggattat gttggtttat 960
ttcgaagca acgcgaagaa ccctaacagg gcttgacatc ctgctaacga agtagagata 1020
cattaggtgc cttcgggga aagtagagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt 1080
cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacccc tattgttagt tgctacgcaa 1140
gagcactcta gcgagactgc cgttgacaaa acggaggaag gcggggacga cgtcaaatca 1200
tcatgcccct tatgtcctgg gctacacacg taatacaatg gcggttaaca aagggatgca 1260
aagccgcgag gcagagcgaa ccccaaaaag ccgtcccagt tcggatcgca ggctgcaacc 1320
cgctgcgtg aagtcggaat cgctagtaat cgcgatcgag catgccgcgg tgaatacgtt 1380
cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgagagtc gggaacaccc gaagtccgta 1440
gcctaaccgc aaggagggcg cgccgaagg tgggttcgat aattggggtg aagtcgtaac 1500
aaggtagccg t 1511

<210> 60

<211> 1499

<212> DNA

<213> 柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1499)

<223> 梭菌菌株40的16S rRNA编码基因序列

<400> 60

agagtttgat cctggctcag gataaacgct ggcggcgatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggagcgcctt ggaaggagac ttcggtcaac ggaagaggag gcttagtggc ggacgggtga 120
gtaacgcgtg aggaacctgc ctgagagagg gggataacac accgaaaggt gtgctaatac 180
cgcataacat atgagagggg catccctttc atatcaaaga tttattgctt tgagatggcc 240
tcgcgtccaa ttagctagtt ggtgaggtaa cgccccacca aggcgacgat tggtagccgg 300
actgagaggt tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca 360
gcagtgggga atattgcaca atgggggggaa ccctgatgca gcaatgccgc gtgaaggatg 420
aaggtttttcg gattgtaaag ttcttttgta cgggacgaag aaagtacgg taccgtaaga 480
ataagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttatc 540
cggatttact ggggtgtaaag ggcgagtagg cgggattgca agtcagatgt gaaaactatg 600

ggctcaaccg atagagtgca ttgaaactg cagttcttga gtgatggaga ggcaggcgga 660
 attccccggtg tagcgggtga atgcgtagat atcgggaggg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
 cctgctggac attaactgac gctgatgcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
 ccctggtagt cacgctgtaa acgatgatta ctaggtgtgg ggggtactga ccccttccc 840
 gtgccggagt taacacaata agtaatccac ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc 900
 aaaggaattg acggggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggttttaatt cgaagcaacg 960
 cgaagaacct taccagggtg tgacatgggg atgaccgctt tagagataga gctttctctt 1020
 cggagacatc ccacacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg 1080
 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagtgtct acgcaagagc actctagcga 1140
 gactgccgtt gacaaaacgg aggaaggtgg ggacgacgtc aaatcatcat gccctttatg 1200
 tcctgggcta cacacgtact acaatggcgg acatacagag ggaagcaaga cagcgatgtg 1260
 gagcaaatcc ctaaaagccg tctcagttca gattgcaggc tgcaaccgcg ctgcatgaag 1320
 tcggaattgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta 1380
 cacaccgccc gtcacaccat gagagtcgga aacaccgaa gcctgtagcc caaccgcaag 1440
 gggggcgcag tcgaaggtgg gtctgataat tggggtgaag tcgtaacaaa ggtagccgt 1499

<210> 61

<211> 1512

<212> DNA

<213> 球形梭菌 (*Clostridium coccoides*)

<220>

<221> rRNA

<222> (1) .. (1512)

<223> 梭菌菌株41的16S rRNA编码基因序列

<400> 61

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60
 ggagatatca ttttcgaagc gattagtta ctaagagcgg agatgttgct atcttagtgg 120
 cggacgggtg agtaacgcgt gggtaacctg cttgcactg ggggataaca ctagaaata 180
 ggtgctaata ccgcataaca gtaggagacg catgtctttt acttgaaaac tccggtggtg 240
 taagatggac ccgcgtctga ttagcttggt ggcggggtaa cggcccacca aggcaacgat 300
 cagtagccgg cctgagaggg tgaacggcca cattgggact gagacacggc ccaaaactct 360
 acgggaggca gcagtgggga atattggaca atggggggaa ccctgatcca gcgacgccgc 420
 gtgagtgaag aagtatttcg gtatgtaaag ctctatcagc aggaagaaa gaaatgacgg 480
 tacctgacta agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtata ctaggggggc 540
 aagcgttatc cggatttact ggggtgtaaag ggagcgtaga cggcgatgca agtctgaagt 600
 gaaaggcggg ggcccaaccc ccggactgct ttggaaactg tatggctgga gtgcaggaga 660
 ggtaagtgga attcctagt tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg 720
 cgaaagcggc ttactggact gtaactgacg ttgaggctcg aaagcgtggg gagcaaaca 780
 gattagatac ctggtagtca cgccgtaaac gatgatcacc ggtttcggtg ggttatggac 840
 ccatcggttg cgcagcaaac gcagtagtga tccacctggg gagtaacgtt cgcaagaatg 900

aaacttcaaa ggaaatgacg ggggacccgg cacaagcgtt ggaggcatgt gtttaattcg 960
aagcaacgcg aagaacctta cccaagtctt gacatcccggt gacgagttag taacgtcact 1020
ttcccttcgg ggcagcggag acaggtgggt catggttggt gtcagctcgt gtcgtgagat 1080
gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cctatcctta gtagccagcg agttaggtcg 1140
ggcactctag ggagactgcc ggggacaacc cggaggaagg tggggatgac gtcaaactcat 1200
catgccccctt atgatttggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgag 1260
cctgtgaagg taagcgaatc ccagaaataa cgtctcagtt cggattgtag tctgcaactc 1320
gactacatga agctggaatc gctagtaatc gcggatcaga atgccgcggt gaatacgttc 1380
ccgggtcttg tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtcg gaaatgcccc aagtctgtga 1440
cccaacctga gaaggaggga gcagccgaag gcaggtcgga tgactggggt gaagtcgtaa 1500
caaggtagcc gt 1512

<210> 62

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 62

ggtgaatacg ttcccgg 17

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 63

tacggctacc ttgttacgac tt 22

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 64

aaatgacggt acctgactaa 20

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 65
ctttgagttt cattcttgcg aa 22
<210> 66
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 66
gcacaagcag tggagt 16
<210> 67
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 67
cttcctccgt tttgtcaa 18
<210> 68
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 68
gagaggaagg tccccac 18
<210> 69
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的
<220>
<223> 人工合成的引物序列
<400> 69
cgctacttgg ctggttcag 19

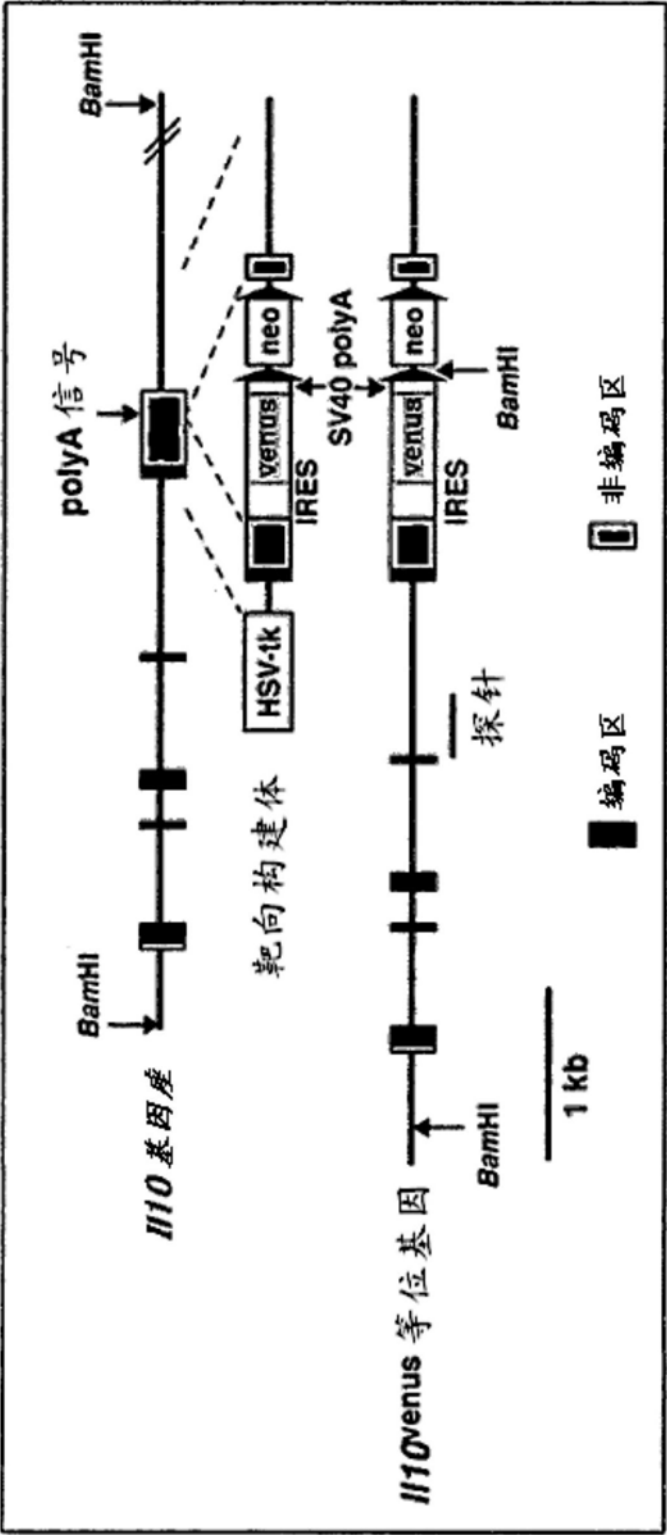


图1

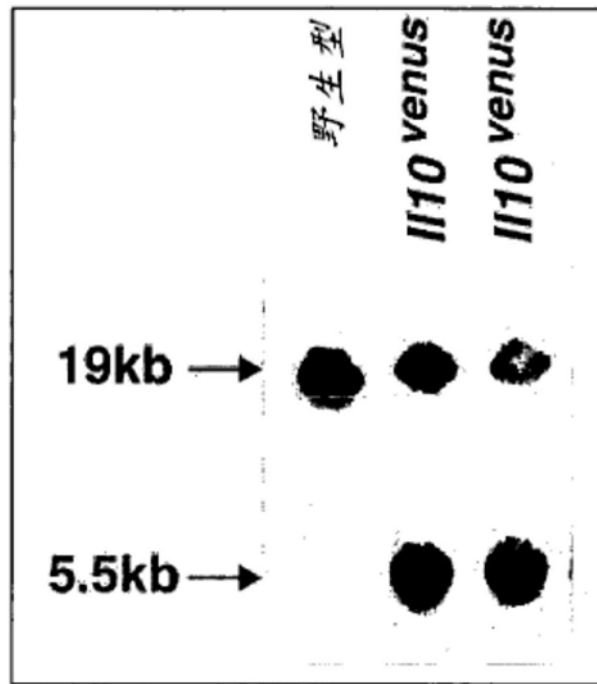


图2

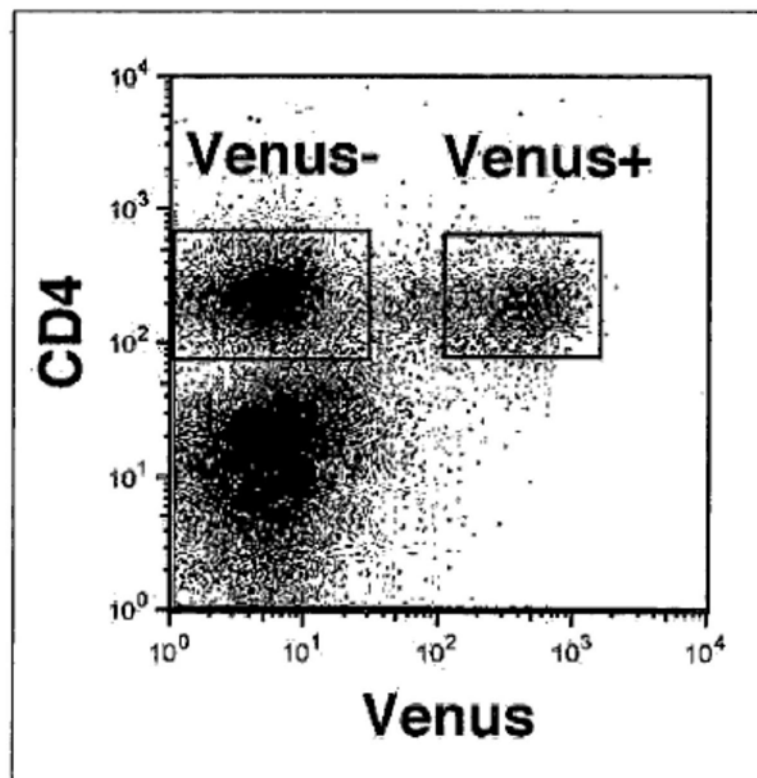


图3

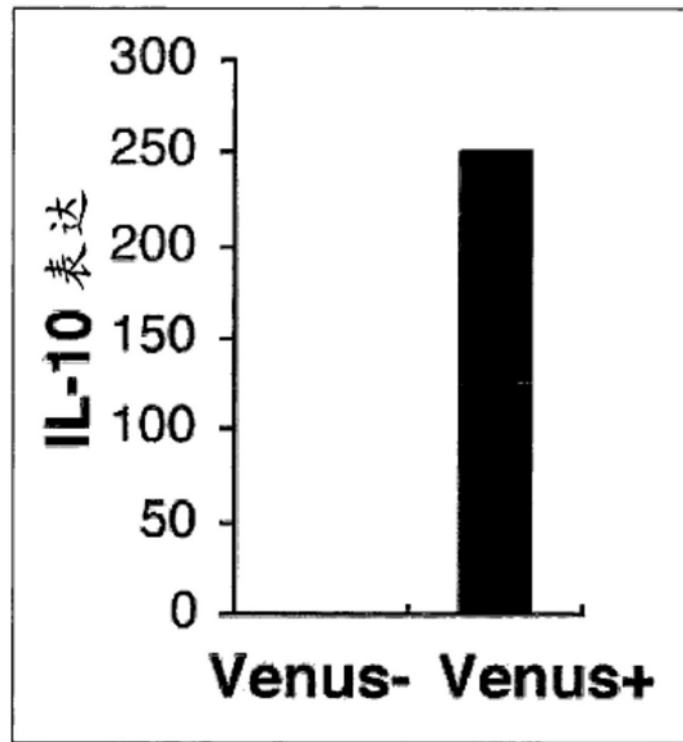


图4

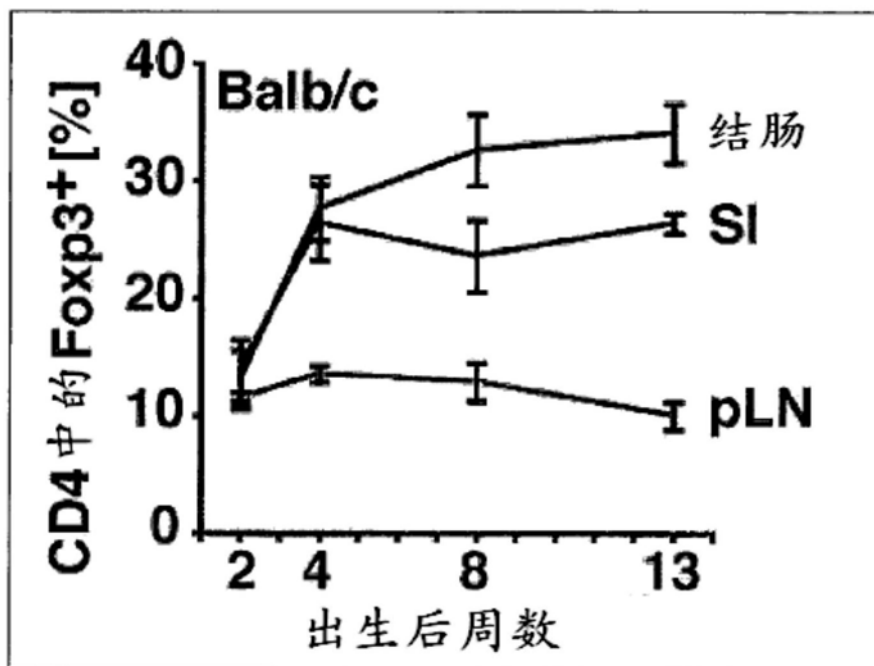


图5

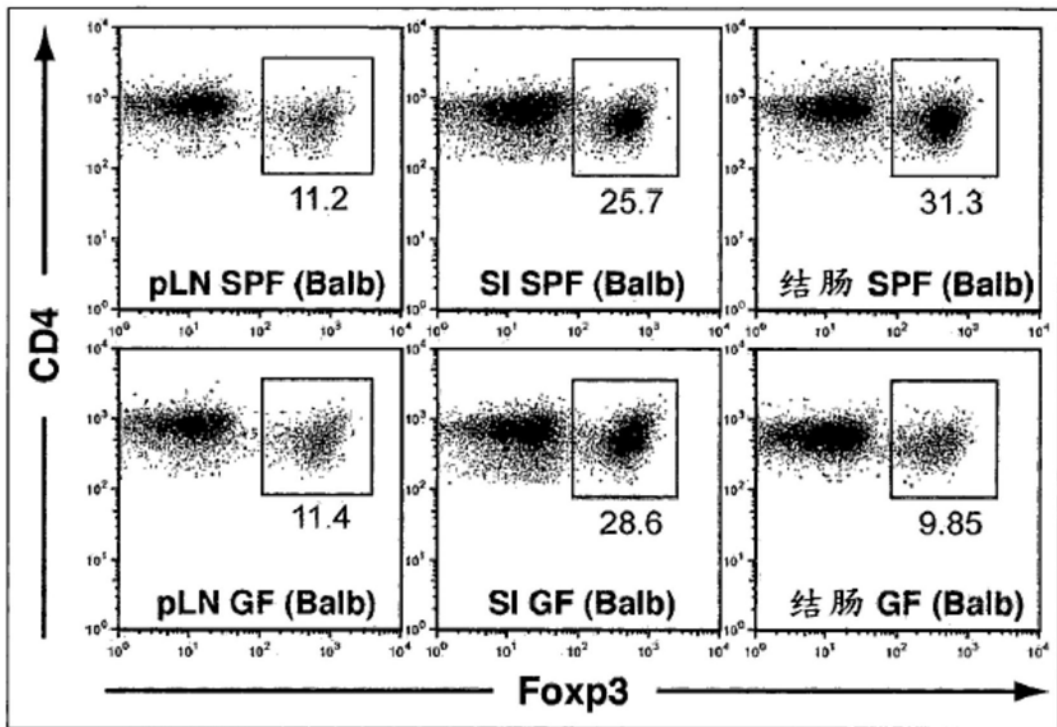


图6

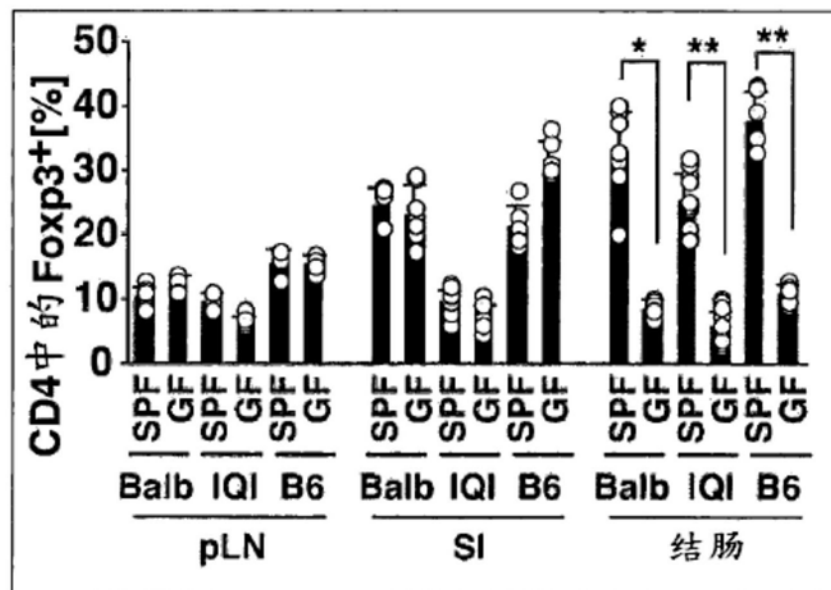


图7

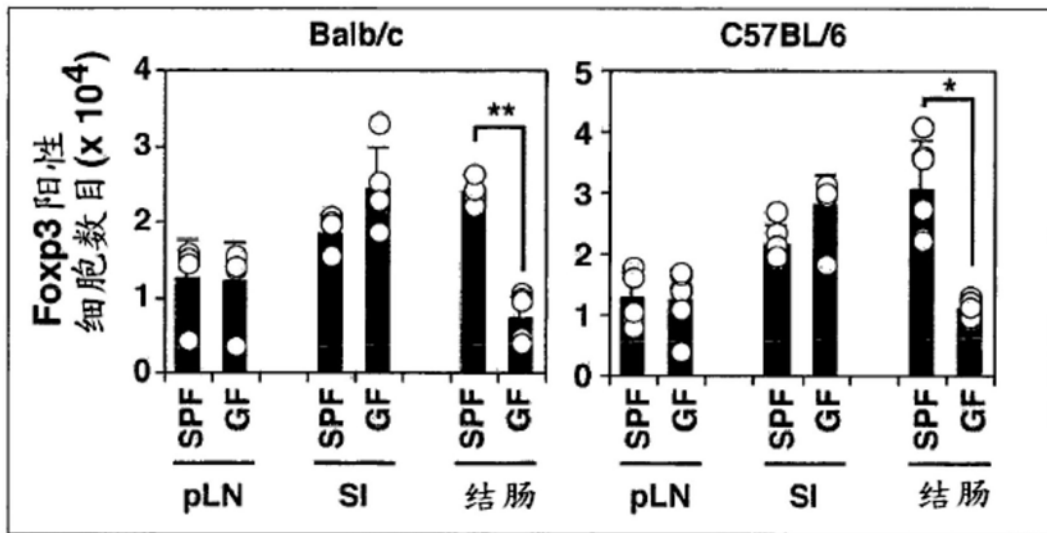


图8

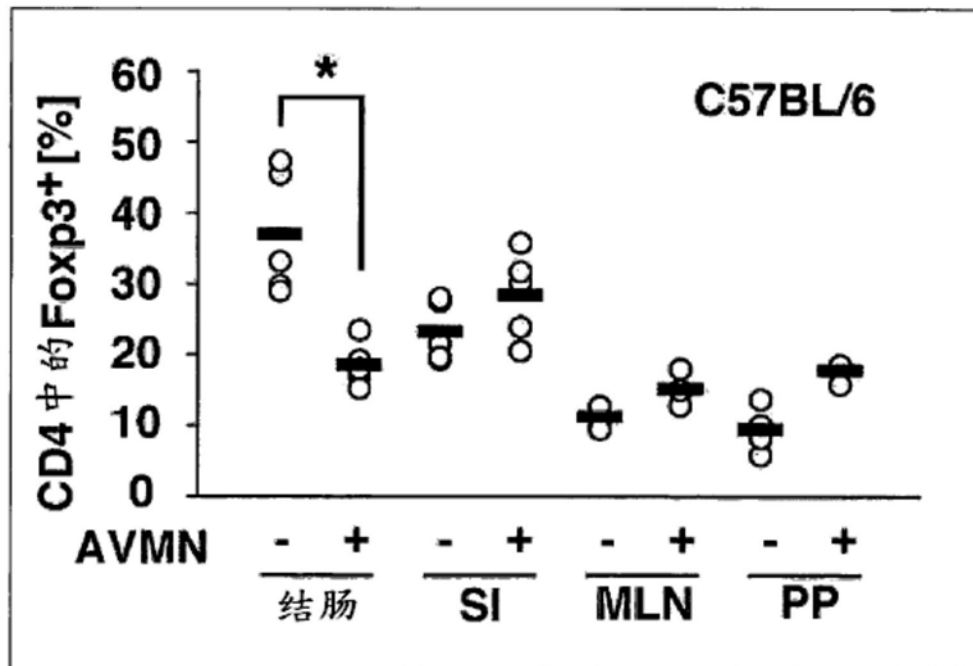


图9

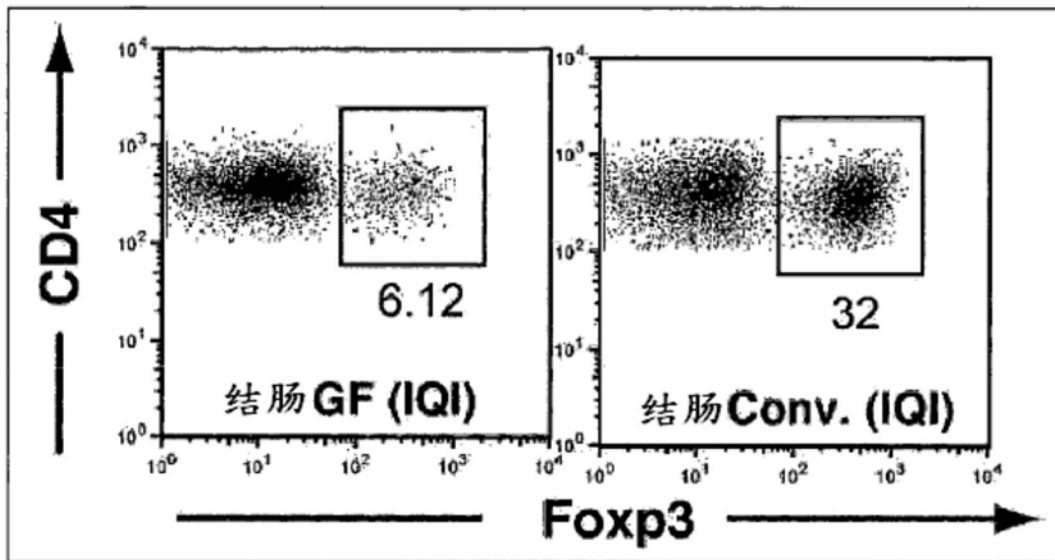


图10

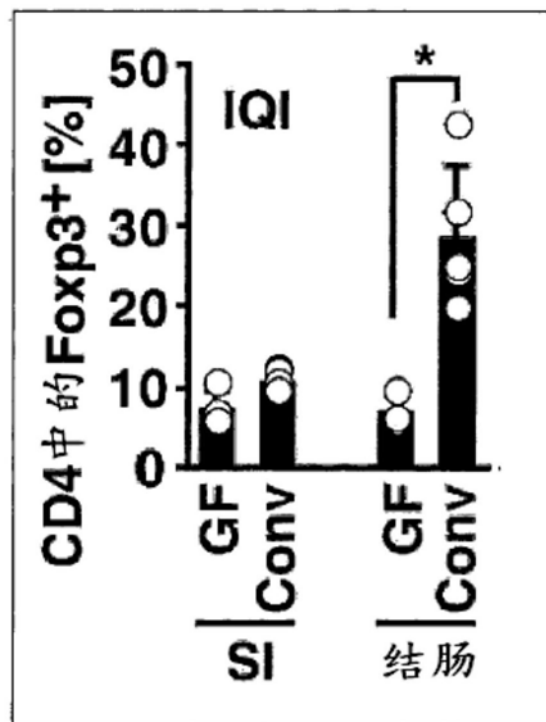


图11

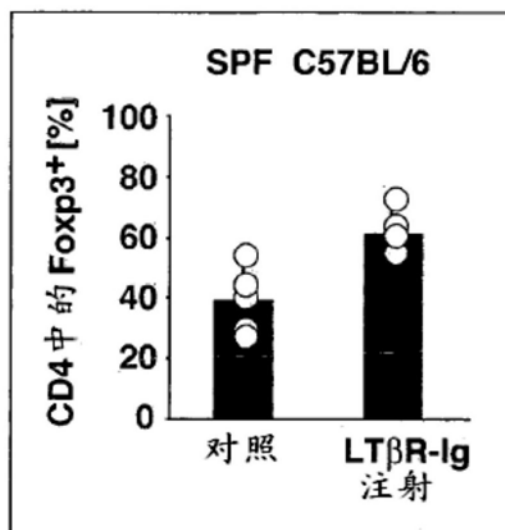


图12

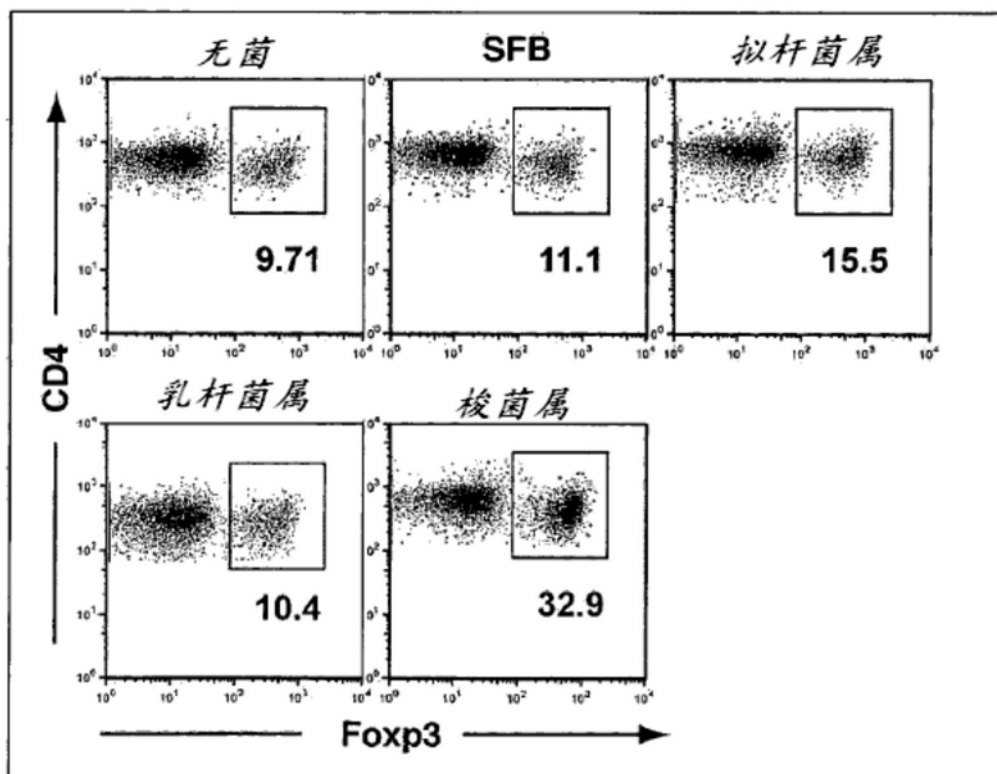


图13

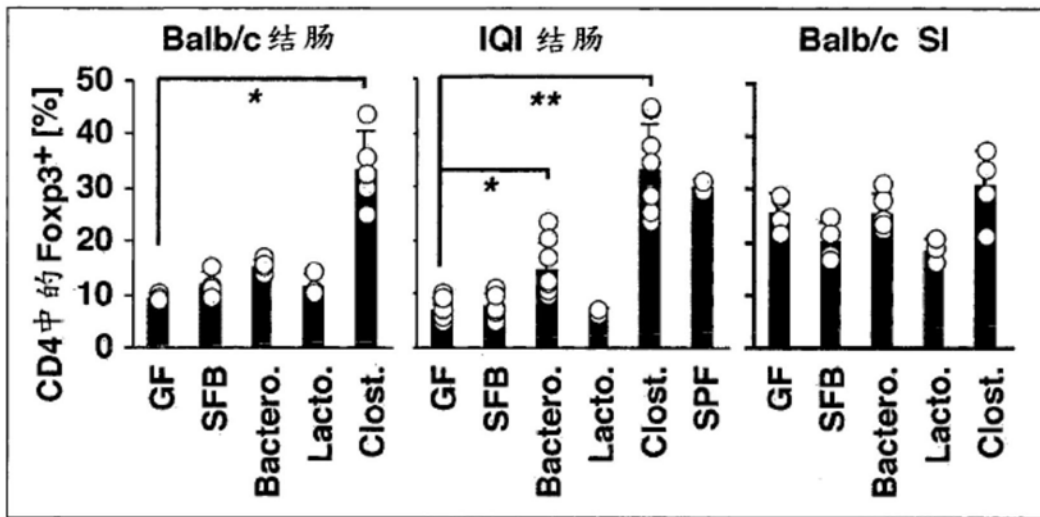


图14

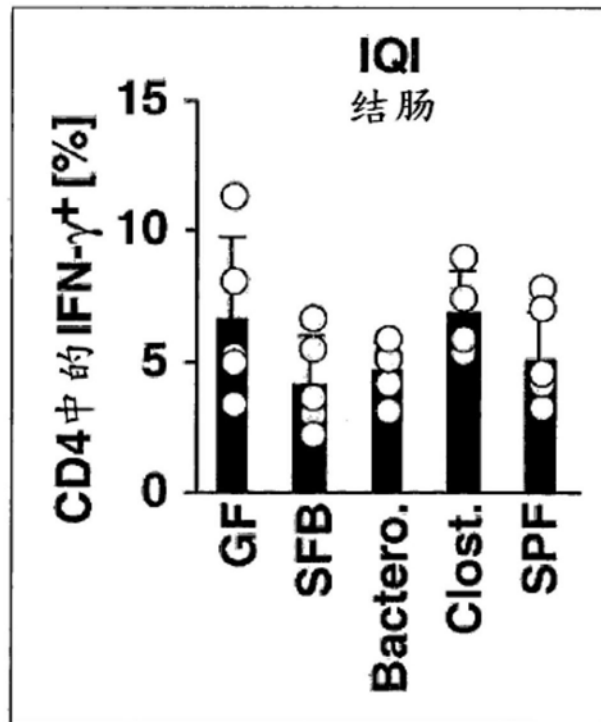


图15

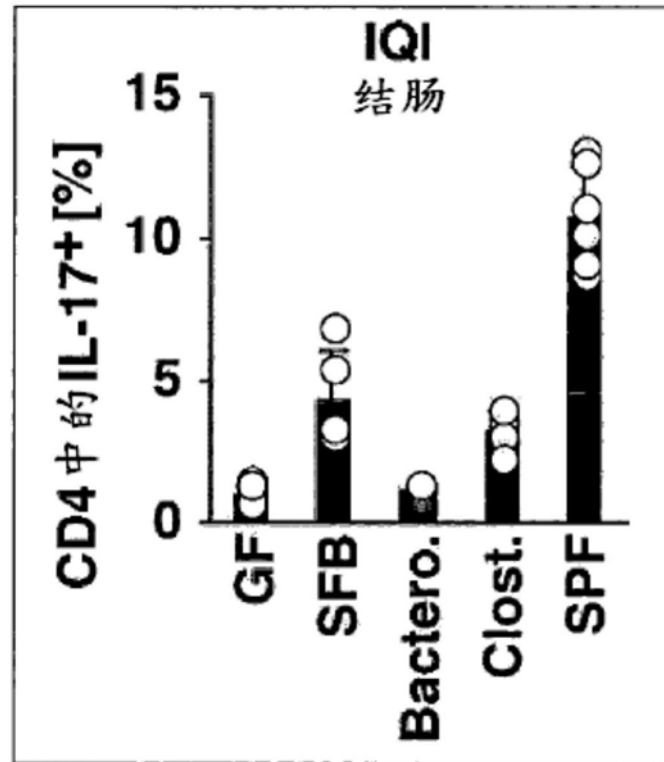


图16

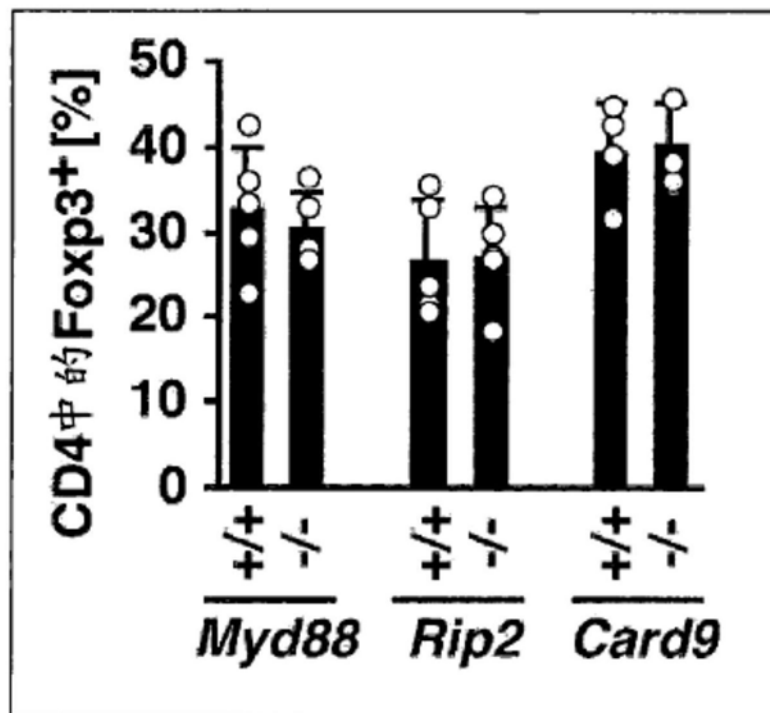


图17

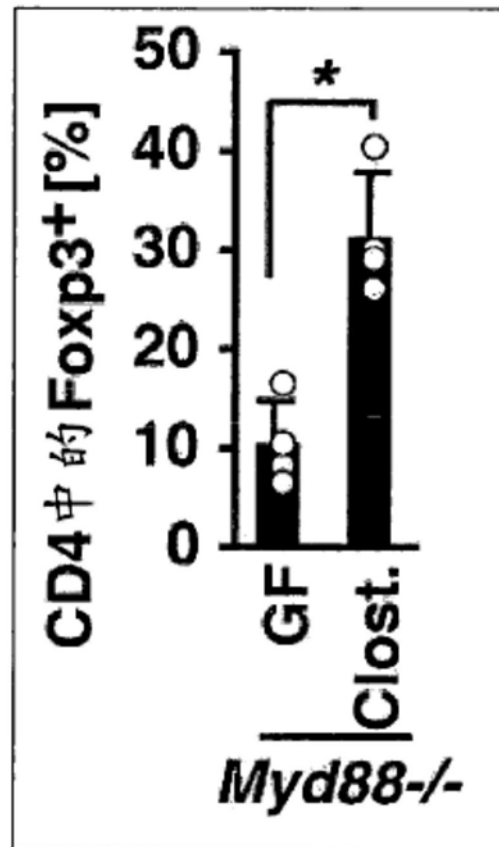


图18

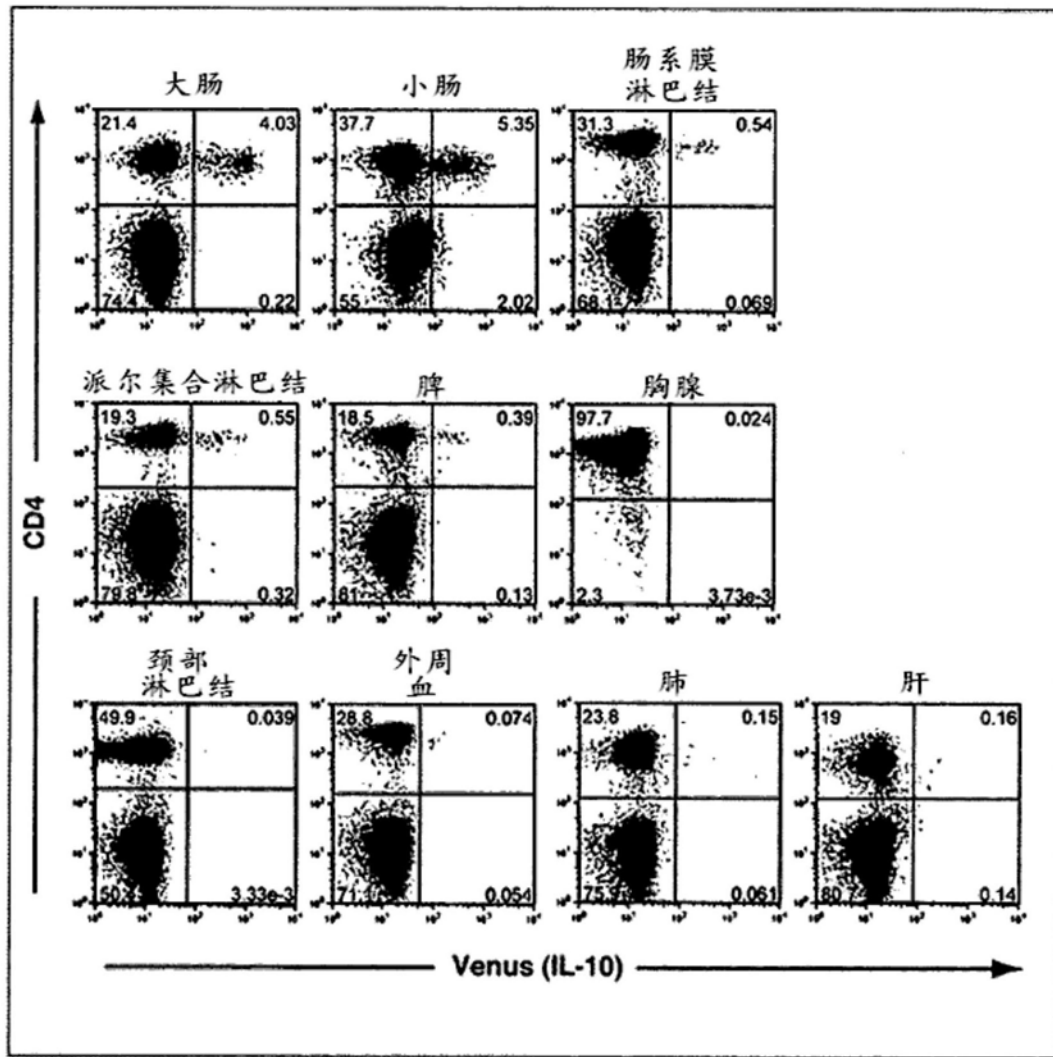


图19

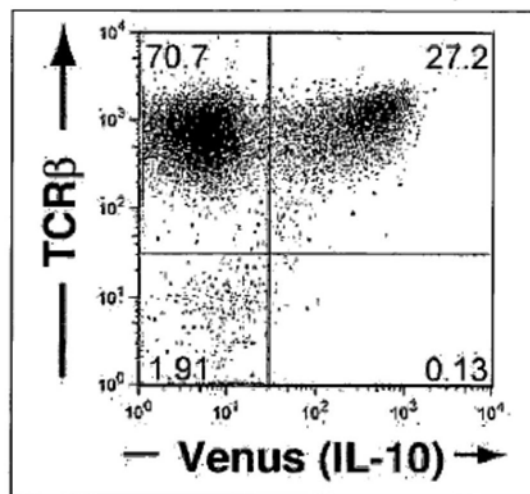


图20

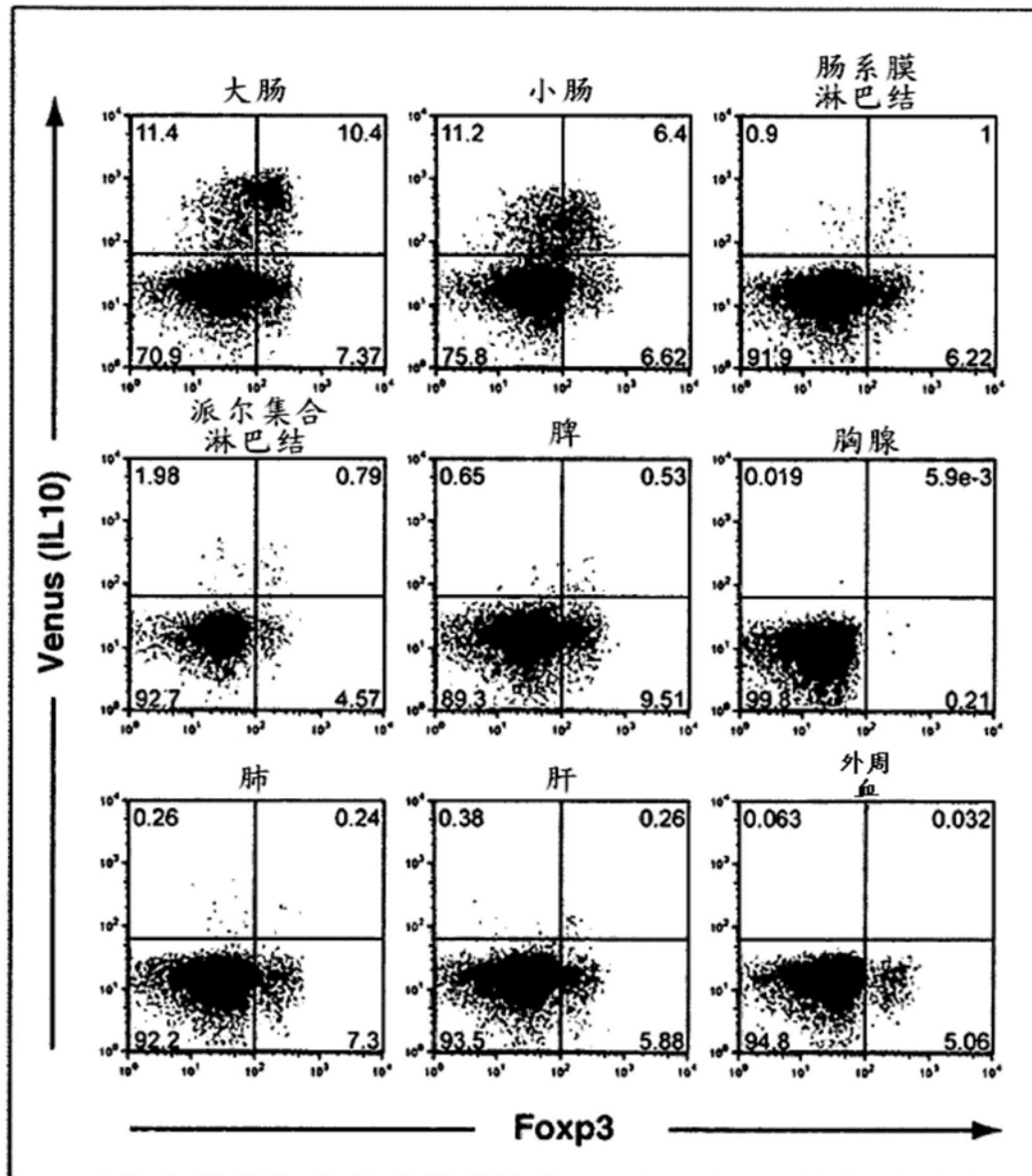


图24

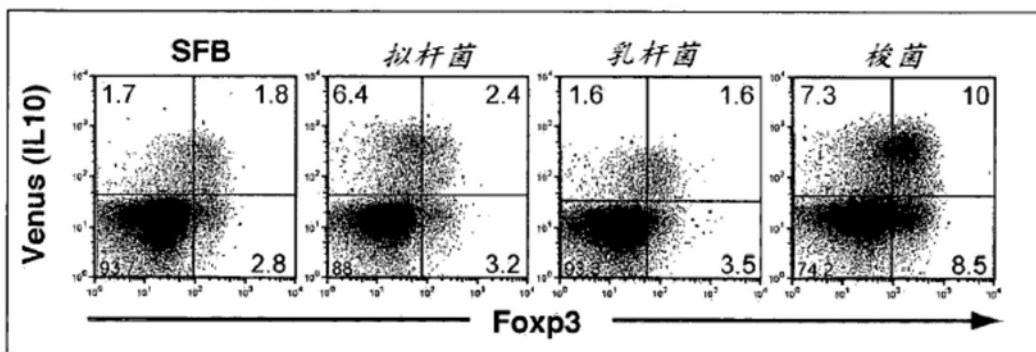


图25

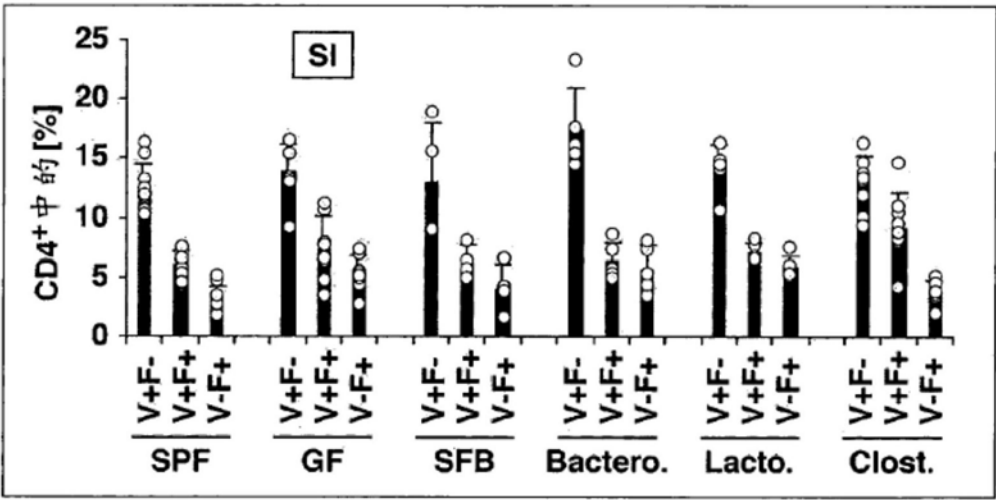


图26

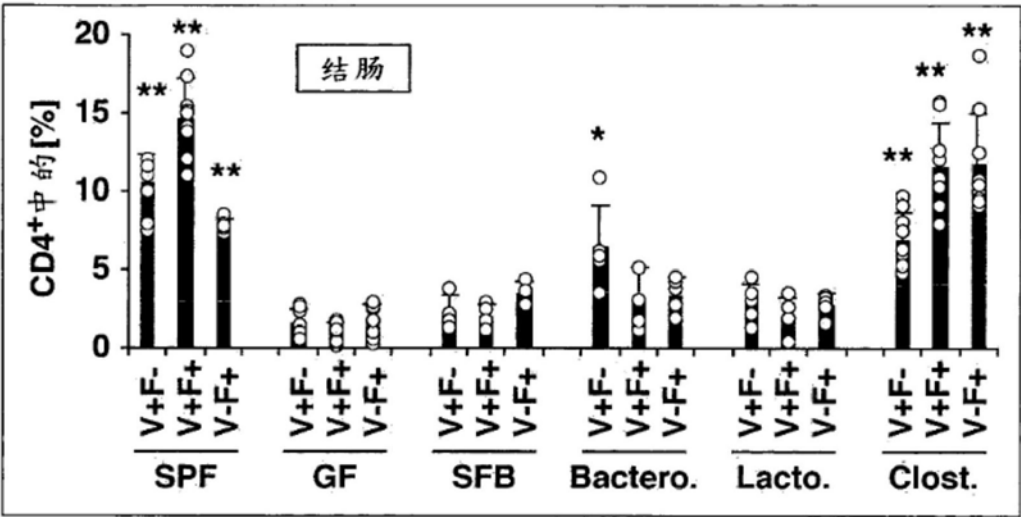


图27

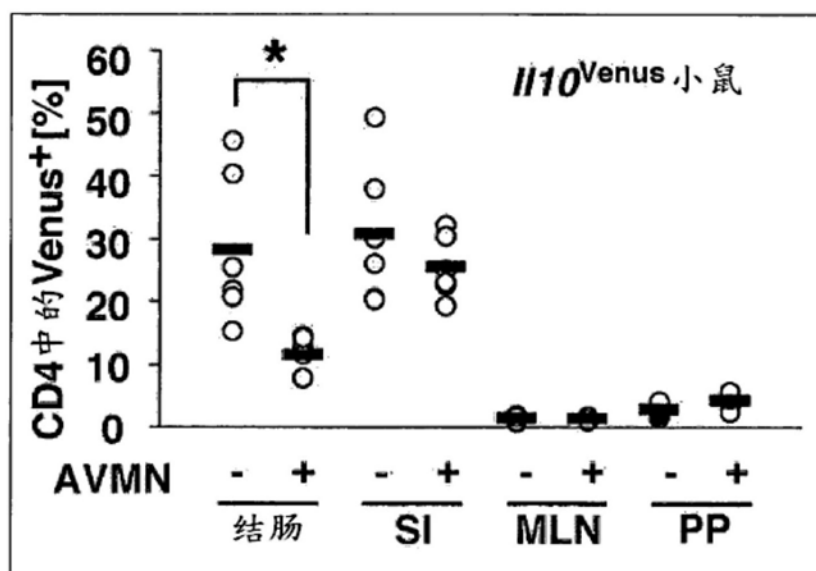


图28

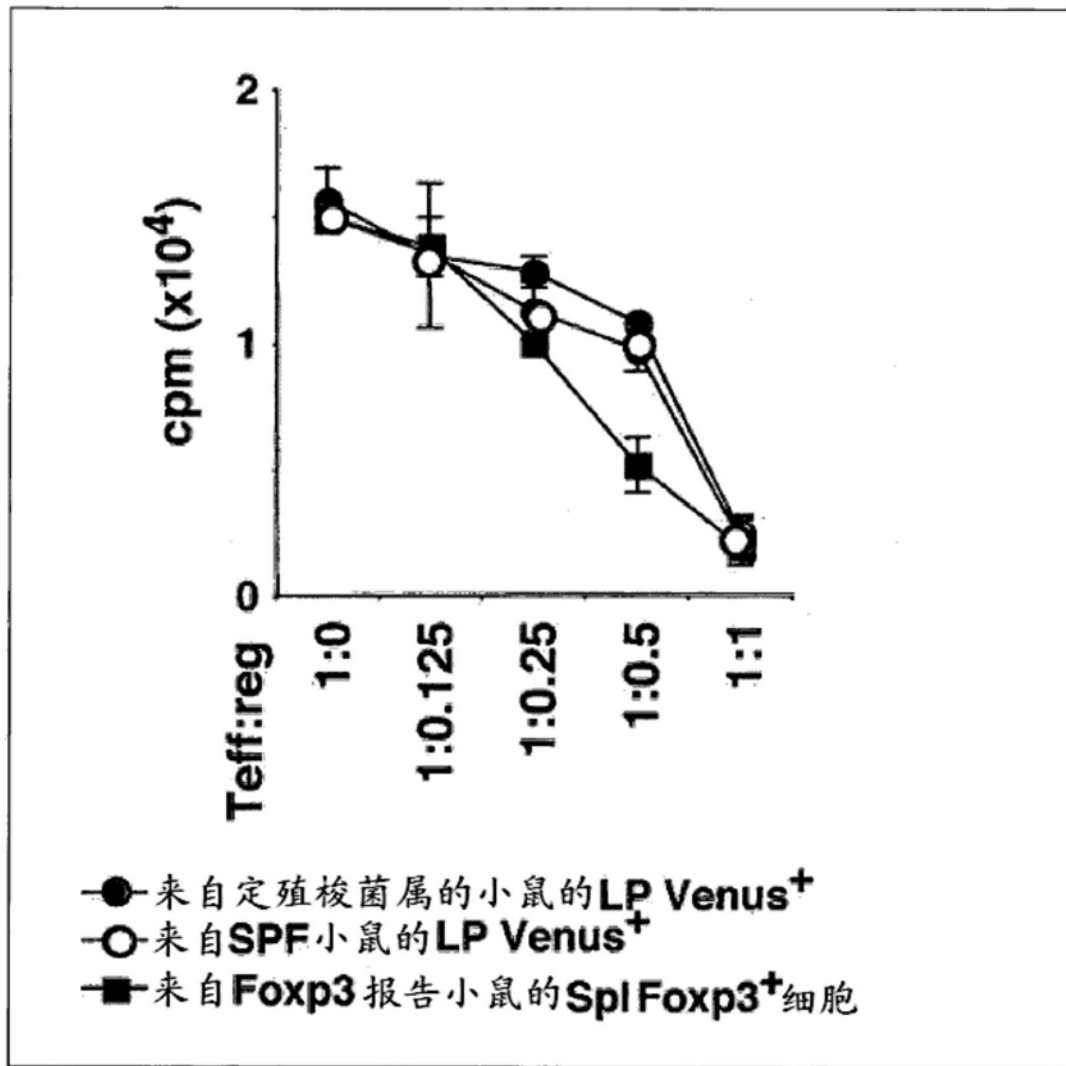


图29

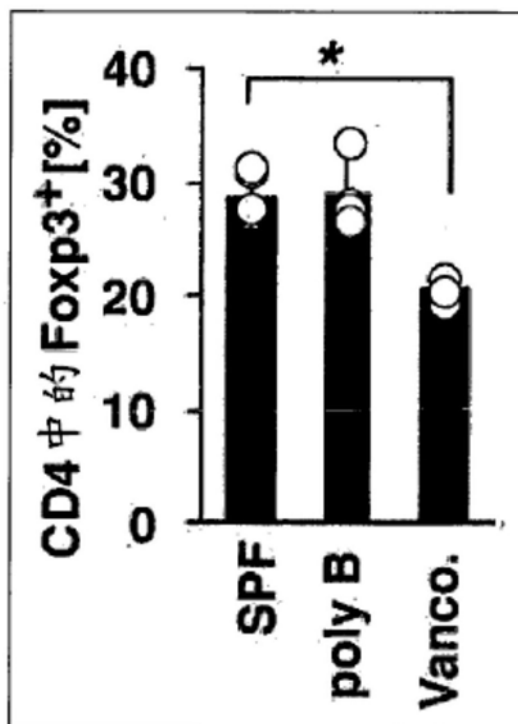


图30

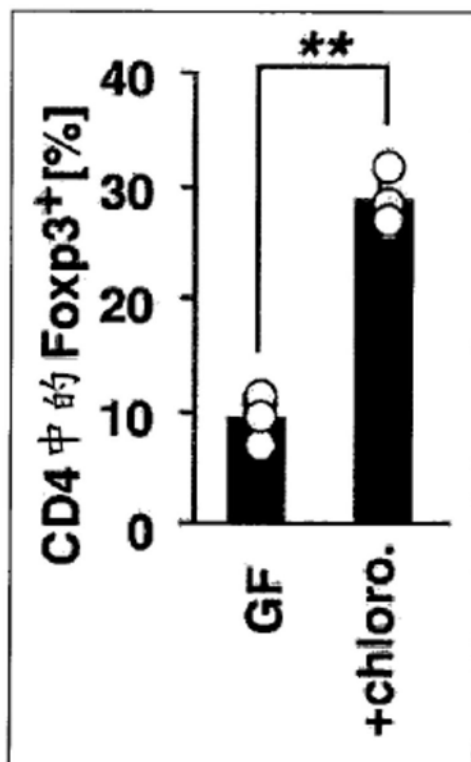


图31

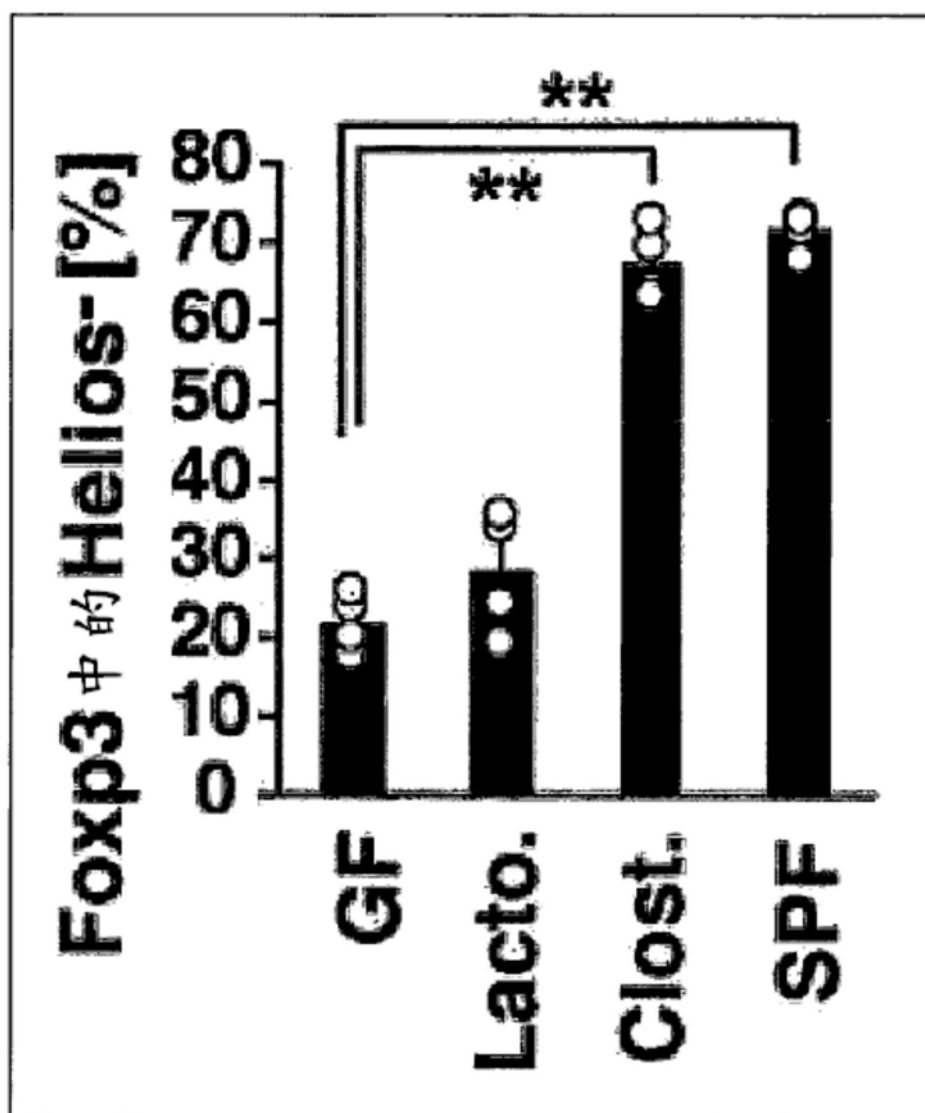


图32

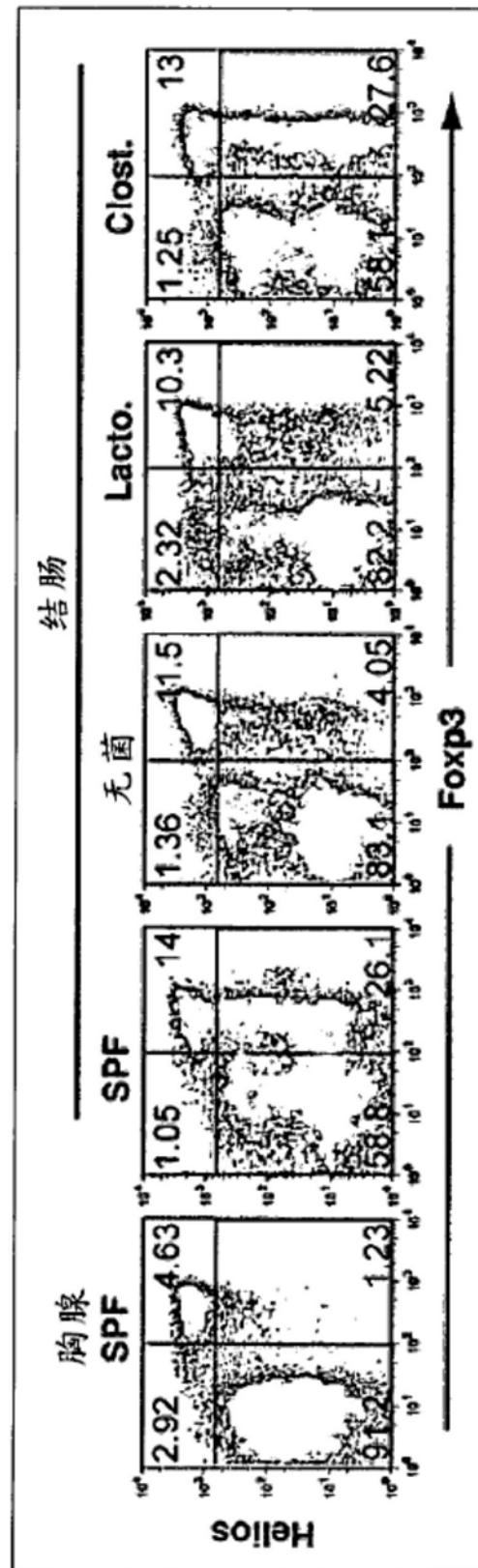


图33

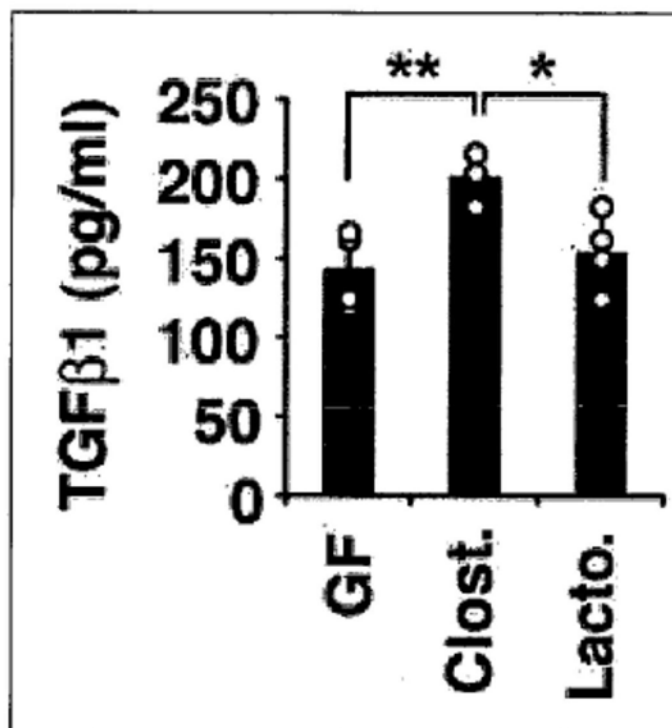


图34

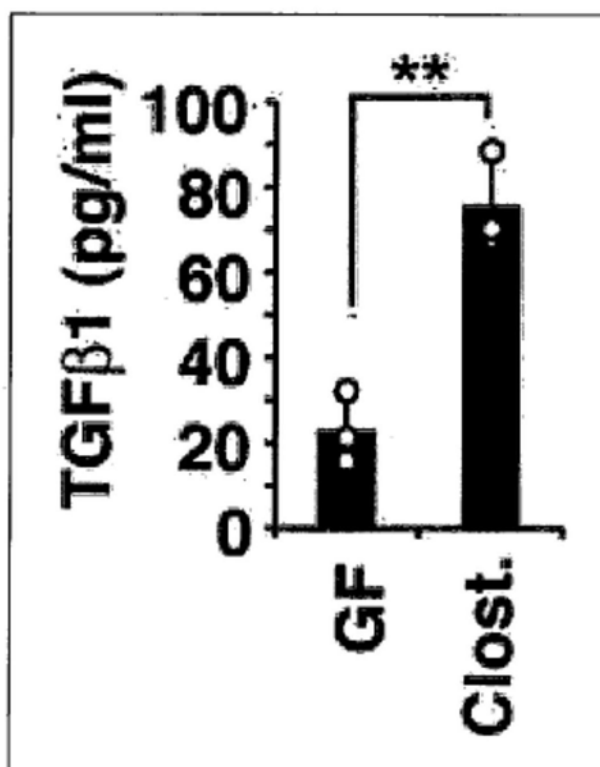


图35

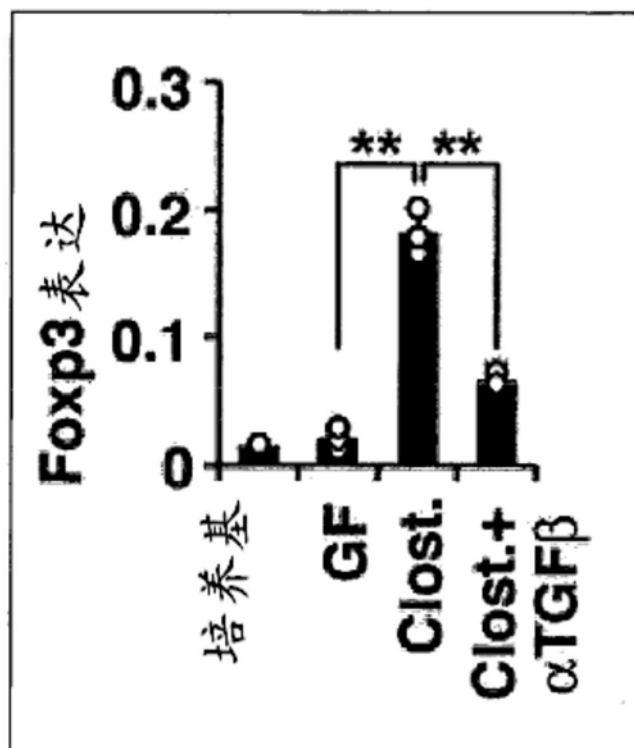


图36

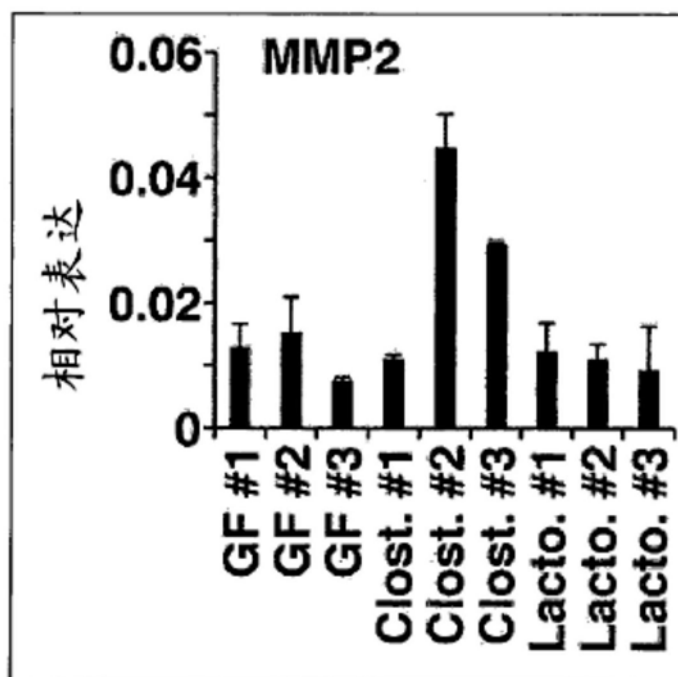


图37

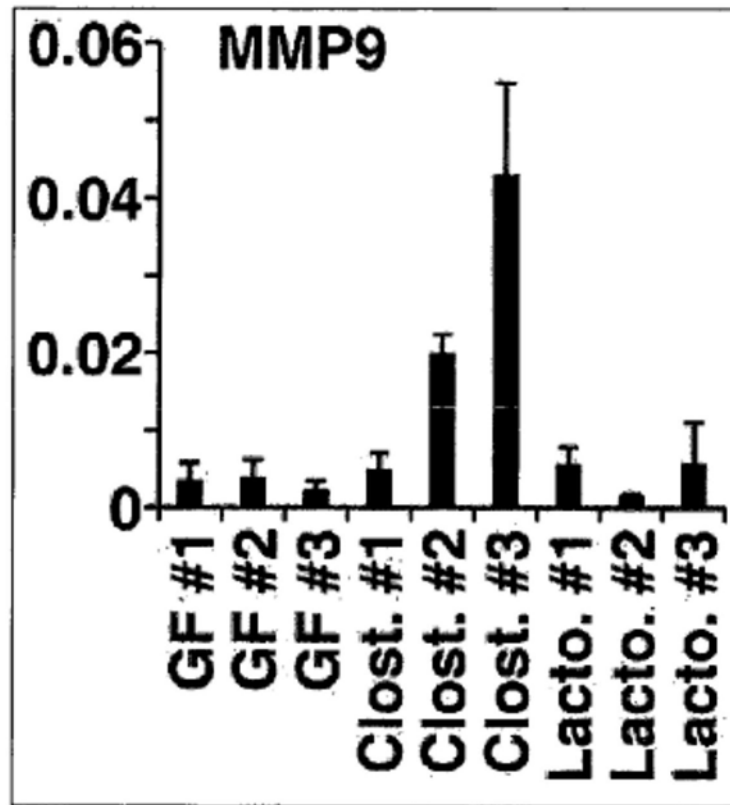


图38

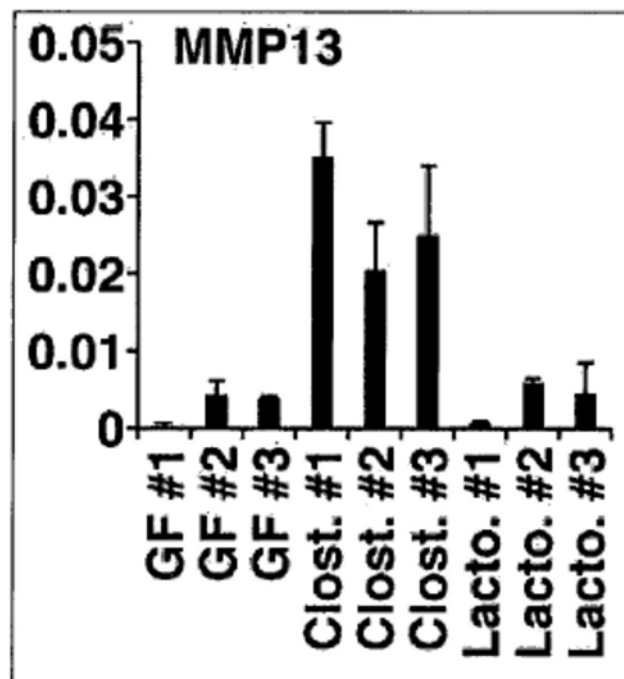


图39

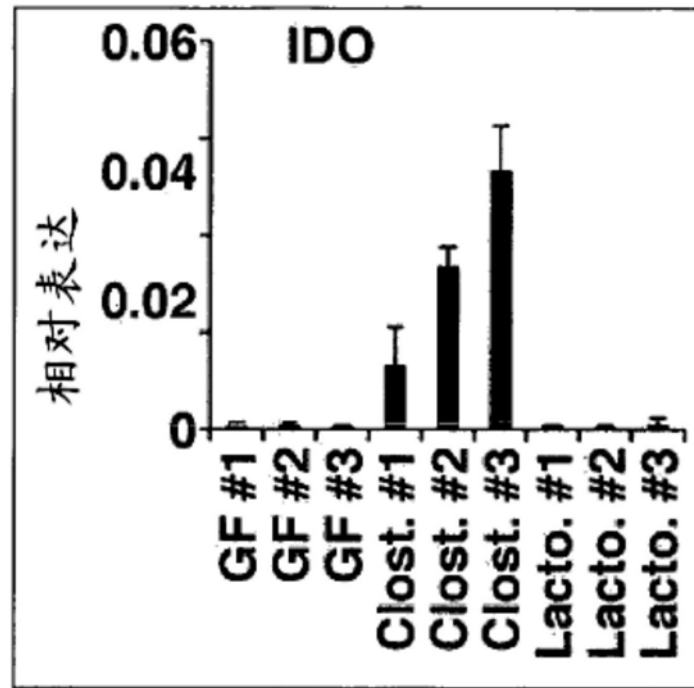


图40

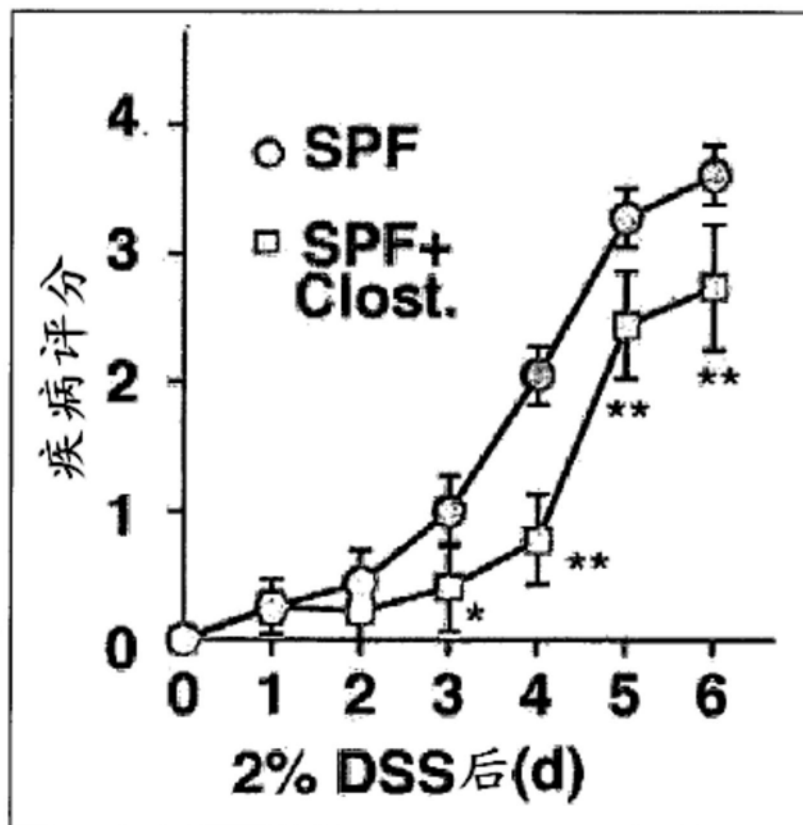


图41

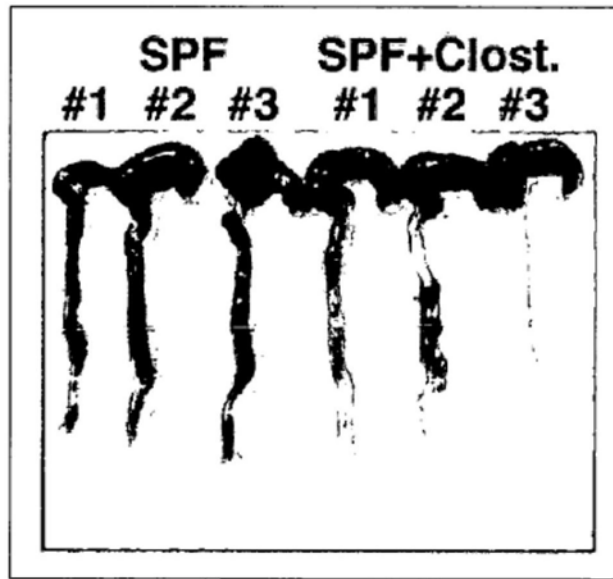


图42

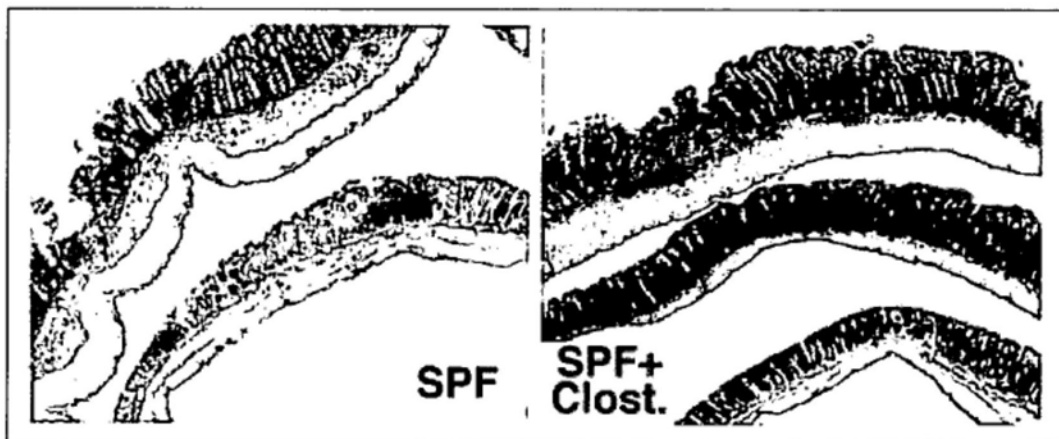


图43

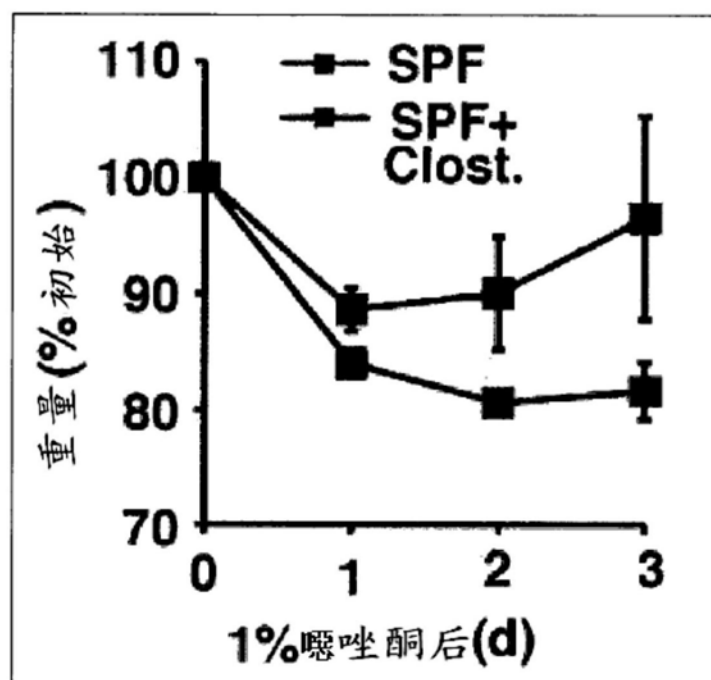


图44

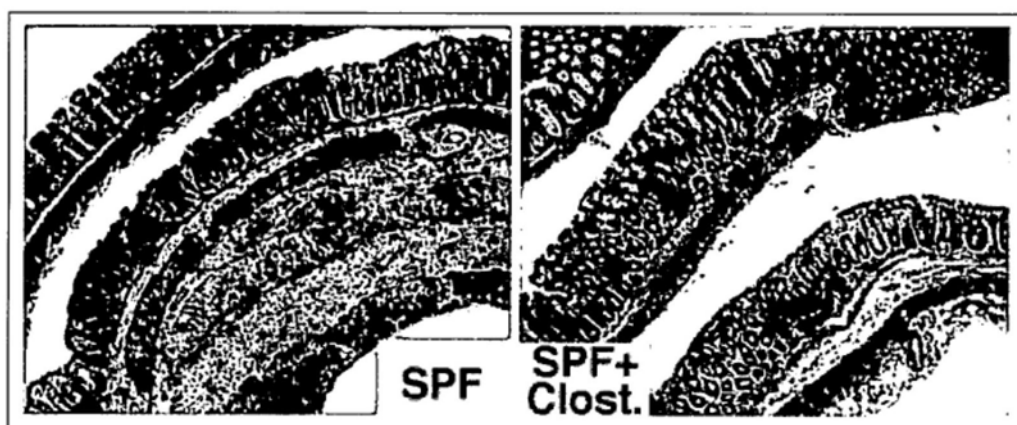


图45

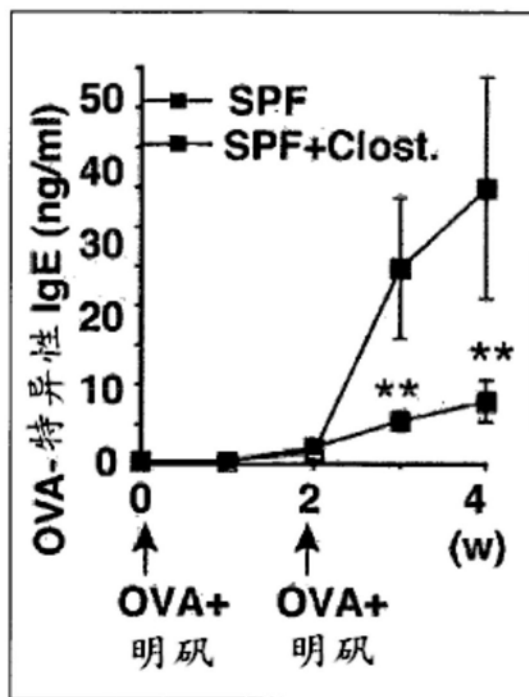


图46

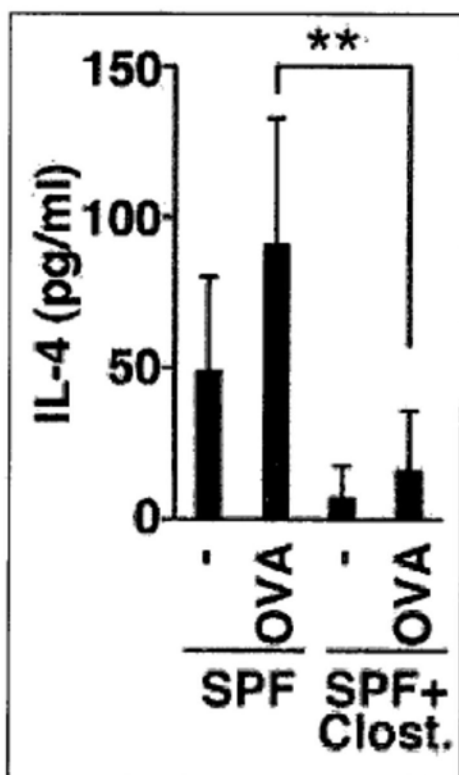


图47

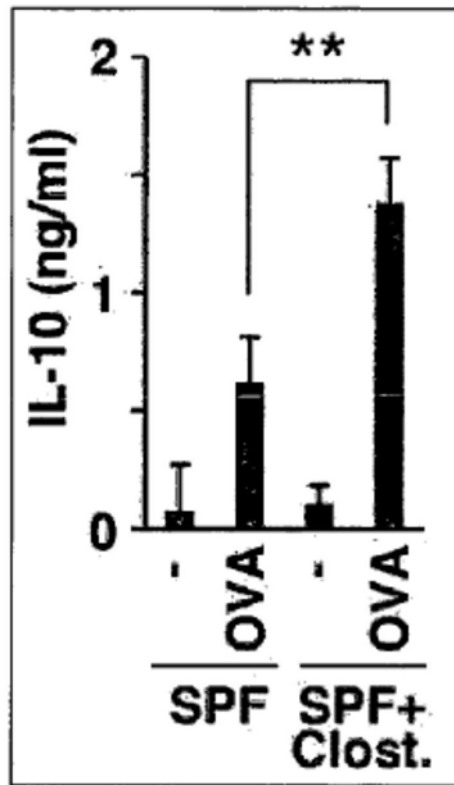


图48

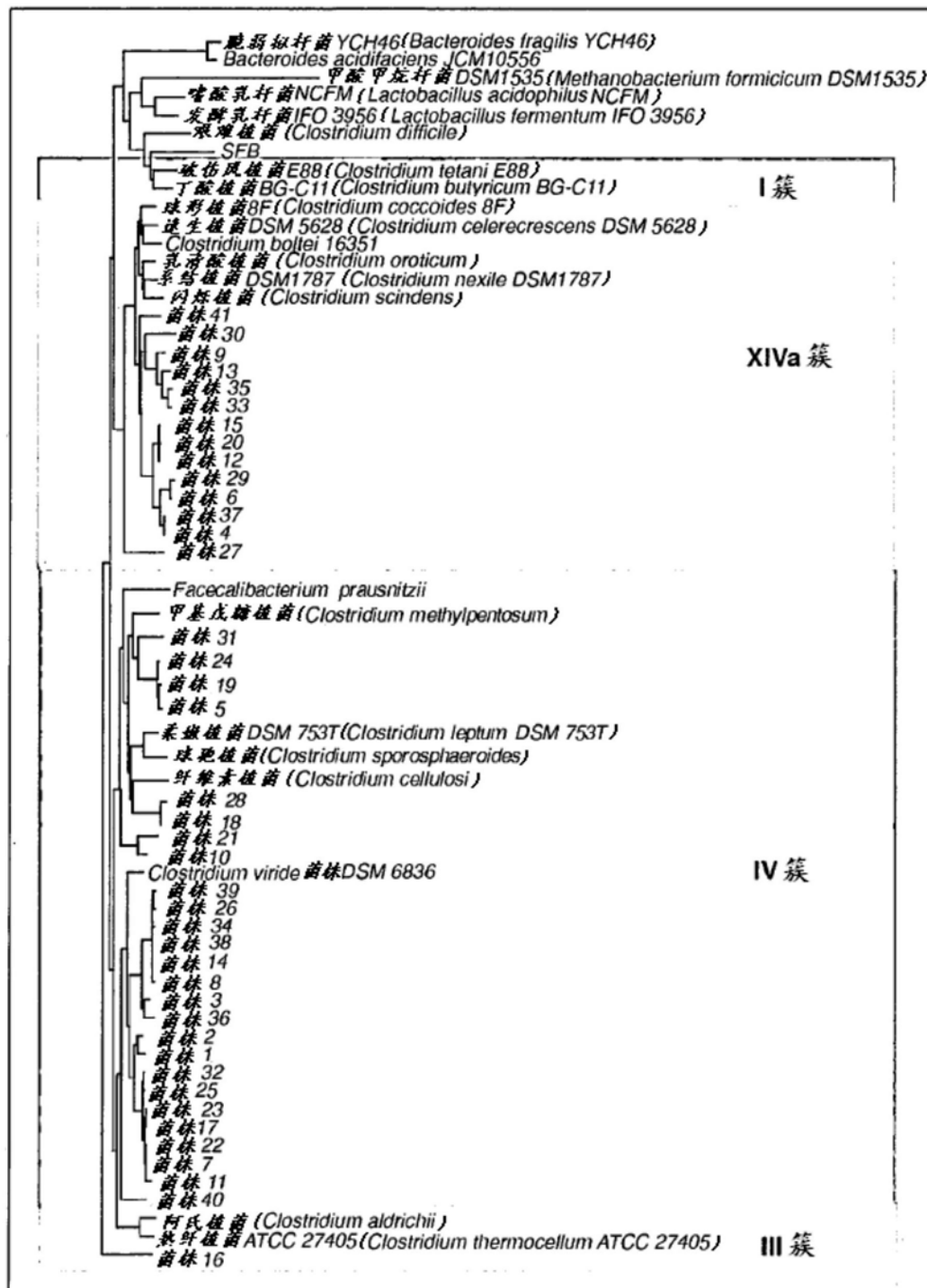


图49

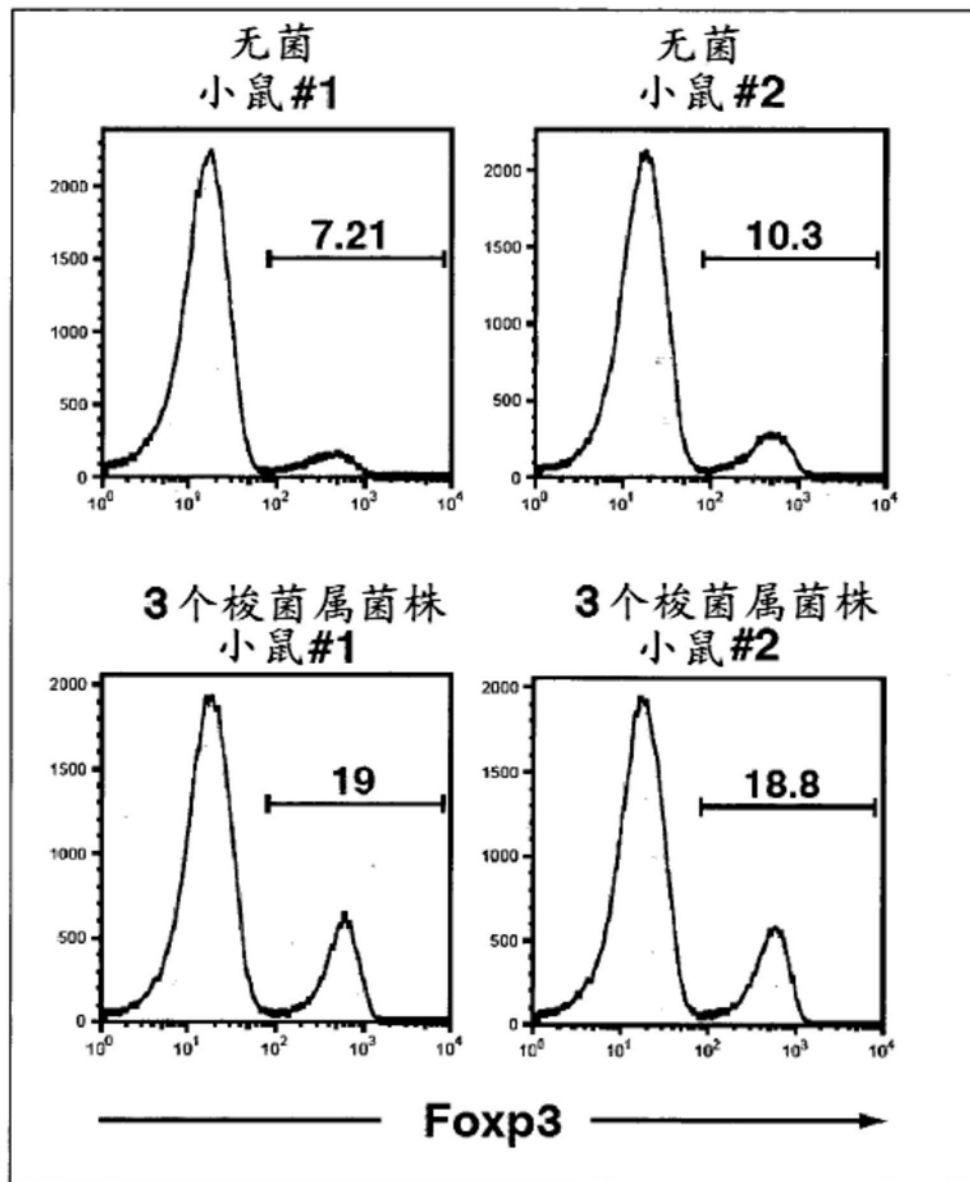


图50

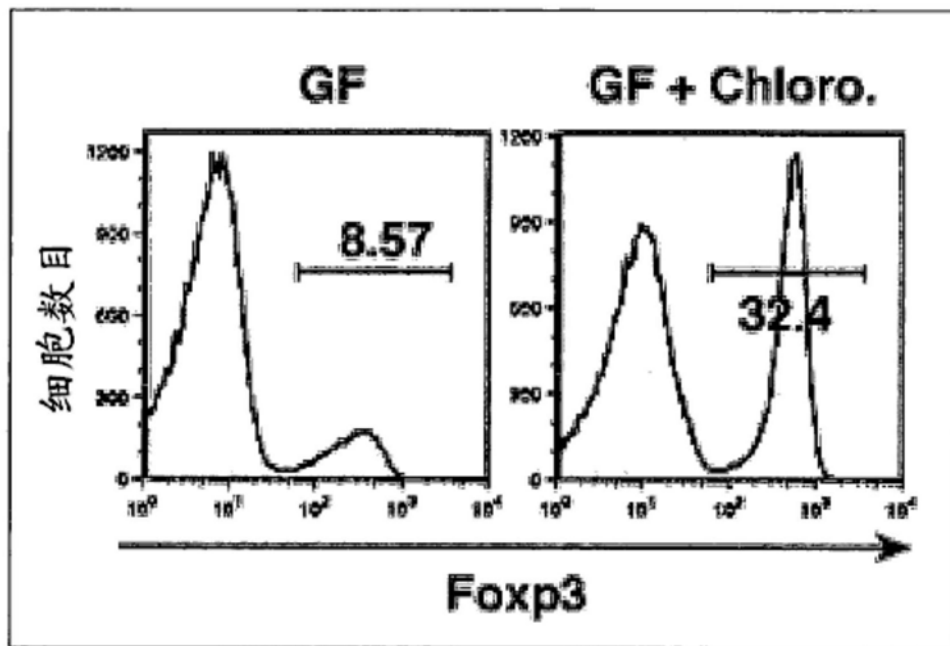


图51

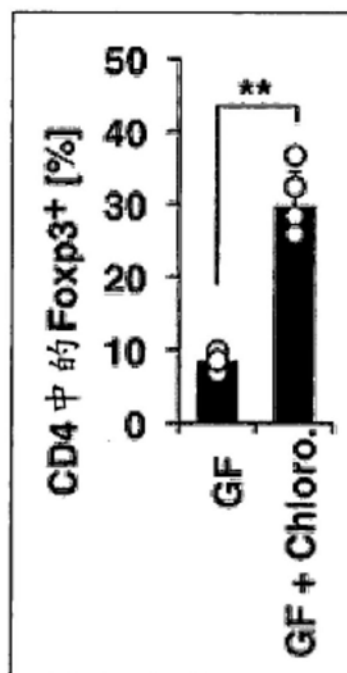


图52

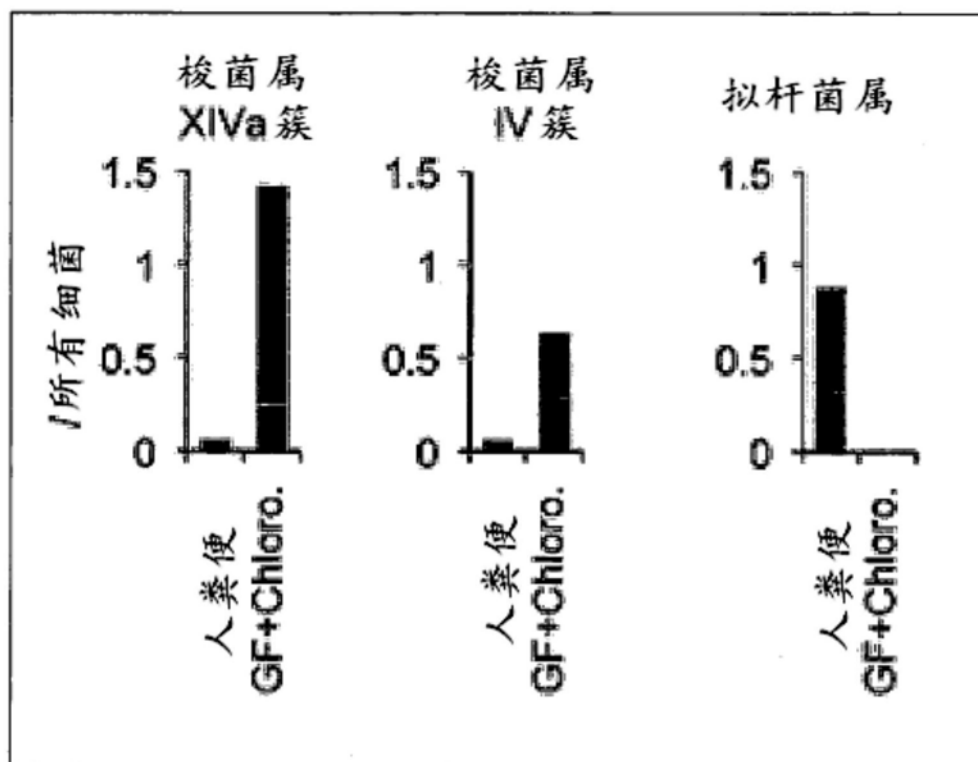


图53