



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109810931 A

(43)申请公布日 2019.05.28

(21)申请号 201910265701.0

(22)申请日 2019.04.03

(71)申请人 广州康泽医疗科技有限公司

地址 510000 广东省广州市海珠区国际生
物岛螺旋四路3号二期二栋304

申请人 彭永正

(72)发明人 彭永正 邓露露 易江丰

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 吕纪涛

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

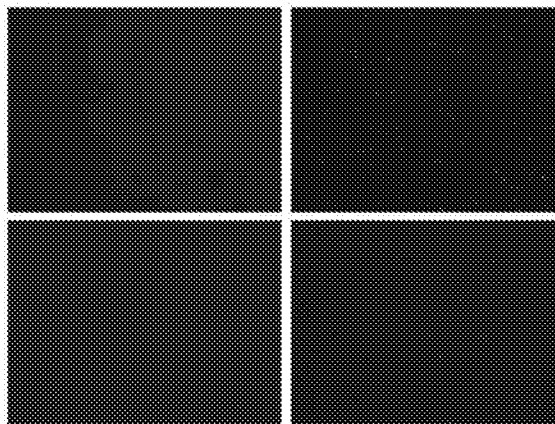
权利要求书1页 说明书12页 附图3页

(54)发明名称

一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法,属于微生物培养基技术领域。所述培养基的组分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、氯化钠和磷酸氢二钠。采用本发明的培养基能够培养得到嗜黏蛋白阿克曼氏菌功能性研究所需的菌量,培养基的组分来源安全,不存在潜在的生物危险。



1. 一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,所述培养基的组分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺,其特征在于,还包括氯化钠和磷酸氢二钠。

2. 根据权利要求1所述的培养基,其特征在于,所述培养基以水为溶剂,每升包括:20~45mmol葡萄糖、12~32g大豆蛋白胨、3~8g苏氨酸、20~35mmol N-乙酰葡萄糖胺、4~6g氯化钠和2~3.5g磷酸氢二钠。

3. 根据权利要求1或2所述的培养基,其特征在于,所述培养基以水为溶剂,每升包括:25~40mmol葡萄糖、16~28g大豆蛋白胨、4~7g苏氨酸、25~30mmol N-乙酰葡萄糖胺、4.5~5.5g氯化钠和2.5~3g磷酸氢二钠。

4. 根据权利要求1或2所述的培养基,其特征在于,所述培养基以水为溶剂,每升包括:30~35mmol葡萄糖、20~24g大豆蛋白胨、5~6g苏氨酸、35mmol N-乙酰葡萄糖胺、5g氯化钠和2.6~2.8g磷酸氢二钠。

5. 权利要求1~4任一项所述的培养基的使用方法,其特征在于,包括:将所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液接种于权利要求1~4任一项所述的培养基中,进行厌氧培养。

6. 根据权利要求5所述的使用方法,其特征在于,所述厌氧培养使用的仪器包括厌氧箱,所述厌氧箱中包括85%CO₂、10%N₂和5%H₂。

7. 根据权利要求5所述的使用方法,其特征在于,所述菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含量为 2.6×10^8 cfu/mL。

8. 根据权利要求5所述的使用方法,其特征在于,所述菌液的接种量为100μL/200μL。

9. 根据权利要求5所述的使用方法,其特征在于,所述厌氧培养的温度为35~40℃。

10. 根据权利要求5所述的使用方法,其特征在于,所述厌氧培养的时间为3~4d。

一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物培养基技术领域,尤其涉及一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法。

背景技术

[0002] 肥胖及其相关的代谢性疾病如糖尿病和心血管疾病已经对公众健康造成重大威胁。我国的形势尤为严峻,现有1亿多糖尿病病人,同时有近5亿人群处于糖尿病前期。因此,研究预防和治疗这类疾病的措施显得尤为重要。

[0003] 肠道菌群与人类健康密切相关,肥胖和胰岛素抵抗是代谢性疾病早期的两个重要特征,肠道菌群在代谢性疾病的发生和进展中起重要作用。肠道菌群的改变,炎症和肠道屏障功能破坏是肥胖和2型糖尿病的重要特征。现有的研究主要集中在分类学上的属、科甚至门水平,精确到种水平和菌株水平的研究较少。研究人体肠道中各种菌株与代谢性疾病的关系,可以发现具有预测和诊断价值的生物标志物,并为进行有效干预提供新靶点。现有的研究表明,肠道共生菌 *Akkermansia muciniphila* 可能就是一种这样的功能菌。

[0004] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 *Akkermansia muciniphila* 是目前疣微菌门中第一种被分离的肠道厌氧菌,于2004年分离成功。最新研究发现, *Akkermansia* 属的 *Akkermansia muciniphila* (以下简称Akk) 可能是衡量肠道微生态是否平衡的重要标志微生物之一。Akk为具有调节血糖稳态等特性的功能菌,在健康人肠道中广泛存在。它具有降解黏蛋白的特性,是生活在宿主肠黏膜黏液表面中的一种重要微生物。

[0005] 因Akk所具有的这些代谢改善的作用,很多学者都将其称为下一代益生菌。考虑到Akk作为一种新型候选益生菌,以其为主要成分的微生物制剂必定具有广阔的发展前景和推广市场,甚至目前国外已经有进行Akk人体试食的实验研究。但是,在实现Akk的市场应用之前,还有许多问题需要解决。

[0006] Akk合成培养基的优化就是这样一个必需而且至关重要的内容。目前国内外对于Akk的培养大都依赖于由牛脑心浸液琼脂干粉和猪胃黏蛋白配制而成的培养基。虽然培养的效果尚可,但是成本较高,而且牛脑心浸液琼脂干粉和黏蛋白都来自于动物,可能会携带未知的病毒和其他危险成分,这种来源的培养基成分的安全性无法得到充分保障。

[0007] 已经有文献报道 (Plovier H, Everard A, Druart C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. [J]. Nature Medicine, 2016, 23(1):107.) 的 Akk合成培养基成分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺。但是用该文献报道的培养基进行Akk的扩增培养,均未获得成功,不能够培养得到Akk菌。

发明内容

[0008] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法,采用本发明提供的培养基能够培养得到嗜黏蛋白阿克曼氏菌,而且培养得到的菌

量能够满足功能性研究的所需。

[0009] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0010] 本发明提供了一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,所述培养基的组分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、氯化钠和磷酸氢二钠。

[0011] 优选的,所述培养基以水为溶剂,每升包括:20~45mmol葡萄糖、12~32g大豆蛋白胨、3~8g苏氨酸、20~35mmol N-乙酰葡萄糖胺、4~6g氯化钠和2~3.5g磷酸氢二钠。

[0012] 优选的,所述培养基以水为溶剂,每升包括:25~40mmol葡萄糖、16~28g大豆蛋白胨、4~7g苏氨酸、25~30mmol N-乙酰葡萄糖胺、4.5~5.5g氯化钠和2.5~3g磷酸氢二钠。

[0013] 优选的,所述培养基以水为溶剂,每升包括:30~35mmol葡萄糖、20~24g大豆蛋白胨、5~6g苏氨酸、35mmol N-乙酰葡萄糖胺、5g氯化钠和2.6~2.8g磷酸氢二钠。

[0014] 本发明还提供了上述技术方案所述的培养基的使用方法,包括:将所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液接种于上述技术方案所述的培养基中,进行厌氧培养。

[0015] 优选的,所述厌氧培养使用的仪器包括厌氧箱,所述厌氧箱中包括85%CO₂、10%N₂和5%H₂。

[0016] 优选的,所述菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含量为 2.6×10^8 cfu/mL。

[0017] 优选的,所述菌液的接种量为100μL/200μL。

[0018] 优选的,所述厌氧培养的温度为35~40℃。

[0019] 优选的,所述厌氧培养的时间为3~4d。

[0020] 本发明提供了一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,所述培养基的组分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、氯化钠和磷酸氢二钠。现有技术中的培养基中含有大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺,不能够培养得到嗜黏蛋白阿克曼氏菌,本发明在现有的基础上添加了氯化钠和磷酸氢二钠,解决了现有培养基中缺少缓冲物质导致嗜黏蛋白阿克曼氏菌无法生长的弊端,添加氯化钠和磷酸氢二钠后,能够使嗜黏蛋白阿克曼氏菌正常生长,能够得到进行该菌的功能性研究时所需的菌量。

附图说明

[0021] 图1为嗜黏蛋白阿克曼氏菌的镜下形态结果;

[0022] 图2为嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌落形态和纯度结果;

[0023] 图3为嗜黏蛋白阿克曼氏菌的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后的成像结果;

[0024] 图4为等体积的黏蛋白培养基和本发明提供的培养基在接种等量Akk后在相同环境中培养相同时间后,取出离心所得到的细菌沉淀图,其中左边的离心管为黏蛋白培养基培养得到的结果,右边的离心管为本发明的培养基培养得到的结果;

[0025] 图5为等体积的黏蛋白培养基和本发明提供的培养基在接种等量Akk后在相同环境中培养相同时间后,经离心后使用等体积的无菌PBS重悬,对菌液进行活菌染色并计数的图,其中,左上为未经接种的本发明培养基作为阴性对照,右上为Akk在本发明的培养基中培养后进行的活菌染色,左下为未经接种的黏蛋白培养基作为阴性对照,右下为Akk在黏蛋白培养基中培养后进行的活菌染色。

具体实施方式

[0026] 本发明提供了一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,所述培养基的组分包括大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖、N-乙酰葡萄糖胺、氯化钠和磷酸氢二钠。在本发明中,所述培养基以水为溶剂,每升优选包括:20~45mmol葡萄糖、12~32g大豆蛋白胨、3~8g苏氨酸、20~35mmol N-乙酰葡萄糖胺、4~6g氯化钠和2~3.5g磷酸氢二钠;可选的包括:25~40mmol葡萄糖、16~28g大豆蛋白胨、4~7g苏氨酸、25~30mmol N-乙酰葡萄糖胺、4.5~5.5g氯化钠和2.5~3g磷酸氢二钠;可选的包括:30~35mmol葡萄糖、20~24g大豆蛋白胨、5~6g苏氨酸、35mmol N-乙酰葡萄糖胺、5g氯化钠和2.6~2.8g磷酸氢二钠。在本发明中,所述氯化钠和磷酸氢二钠作为培养基的缓冲物质,解决了在含有大豆蛋白胨、苏氨酸、葡萄糖和N-乙酰葡萄糖胺的培养基中不能够得到嗜黏蛋白阿克曼氏菌的弊端,能够得到该菌。在本发明中,当所述每升培养基中的氯化钠的浓度高于6g时,不利于嗜黏蛋白阿克曼氏菌的生长。

[0027] 本发明还提供了上述技术方案所述的培养基的使用方法,包括:将所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液接种于上述技术方案所述的培养基中,进行厌氧培养。

[0028] 在本发明中,所述厌氧培养优选在85%CO₂、10%N₂和5%H₂下进行,所述厌氧培养使用的仪器优选为厌氧箱。在本发明中,所述厌氧培养的温度优选为35~40℃,所述厌氧培养的时间优选为3~4d。

[0029] 在本发明中,所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液的接种量优选为100μL/200μL,所述菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含量为 2.6×10^8 cfu/mL。本发明对所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液的来源没有特殊限定,采用常规制备方法制备得到即可。本发明对所述接种的方法和使用的工具没有特殊限定,采用常规即可。

[0030] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0031] 实施例1

[0032] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.72g葡萄糖、2.4g大豆蛋白胨、0.6g苏氨酸、0.88gN-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.4g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0183。

[0033] 将菌液接种于黏蛋白液体培养基后,培养2~3天,取出离心,将沉淀进行革兰染色,镜检观察保种菌的镜下形态(结果如图1)。同时,将活菌沉淀分区划线接种于黏蛋白平板,培养2天后取出,观察保种菌的菌落形态和纯度(结果如图2)。最后,以菌液为模板,使用嗜黏蛋白阿克曼氏菌引物进行PCR扩增,对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,通过全自动凝胶成像系统判断原始模板DNA的分子量(结果如图3)。

[0034] 从图1中可以得出,菌液中的菌为革兰阴性短杆状,符合嗜黏蛋白阿克曼氏菌的镜下形态特点,而且镜下并未见其它明显杂菌,证明菌液中的菌为纯菌。从图2中可以得出,菌液中的菌落细小,为白色透明状,符合嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌落形态特点,而且平板上并无其它杂菌生长,证明菌液中的菌为纯菌。从图3中可以得出,菌液作为模板进行PCR扩增

后,其DNA分子量大小在250~500bp之间,位置偏中下,稍接近于250bp线,符合过往的报道,即嗜黏蛋白阿克曼氏菌经同样的引物扩增后DNA分子量为327bp。综上,能够得出菌液中的菌为纯的嗜黏蛋白阿克曼氏菌。

[0035] 半胱氨酸是一种还原剂,能够消耗培养基中的氧气,有利于嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧生长。以下实施例和对比例中,半胱氨酸的作用与实施例1相同。

[0036] 实施例2

[0037] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.72g葡萄糖、3.2g大豆蛋白胨、0.8g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0343。

[0038] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0039] 实施例3

[0040] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.72g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.328gN-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.6g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0423。

[0041] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0042] 实施例4

[0043] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.72g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.548g N-乙酰葡萄糖胺、1.2g氯化钠和0.7g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.063。

[0044] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0045] 实施例5

[0046] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.9g葡萄糖、2.4g大豆蛋白胨、0.6g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.7g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为

0.0143。

[0047] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0048] 实施例6

[0049] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.9g葡萄糖、3.2g大豆蛋白胨、0.8g苏氨酸、0.884g N-乙酰葡萄糖胺、1.2g氯化钠和0.6g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0253。

[0050] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0051] 实施例7

[0052] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.9g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.548gN-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.027。

[0053] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0054] 实施例8

[0055] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.9g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.328gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.4g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0513。

[0056] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0057] 实施例9

[0058] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、2.4g大豆蛋白胨、0.6g苏氨酸、1.328g N-乙酰葡萄糖胺、1.2g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200μL半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0087。

[0059] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0060] 实施例10

[0061] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、3.2g大豆蛋白胨、

0.8g苏氨酸、0.884g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.4g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.035。

[0062] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0063] 实施例11

[0064] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1.25g苏氨酸、1.548g N-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.7g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0687。

[0065] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0066] 实施例12

[0067] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.6g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.087。

[0068] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0069] 实施例13

[0070] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、2.4g大豆蛋白胨、0.6g苏氨酸、1.548gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.6g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.0093。

[0071] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0072] 实施例14

[0073] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、3.2g大豆蛋白胨、0.8g苏氨酸、1.328g N-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.7g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于

厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.0187。

[0074] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0075] 实施例15

[0076] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.26g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1.2g氯化钠和0.4g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 4d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.0043。

[0077] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0078] 实施例16

[0079] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.26g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、0.884g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 4d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.097。

[0080] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0081] 实施例17

[0082] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.08g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、0.8g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 4d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1083。

[0083] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0084] 实施例18

[0085] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.08g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 4d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1193。

[0086] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0087] 实施例19

[0088] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、5.6g大豆蛋白胨、1.4g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.137。

[0089] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0090] 实施例20

[0091] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.08g葡萄糖、6.4g大豆蛋白胨、1.6g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1427。

[0092] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0093] 实施例21

[0094] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)4d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1050。

[0095] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0096] 实施例22

[0097] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1120。

[0098] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0099] 实施例23

[0100] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、5.6g大豆蛋白胨、

1.4g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1423。

[0101] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0102] 实施例24

[0103] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.26g葡萄糖、6.4g大豆蛋白胨、1.6g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.8g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1367。

[0104] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0105] 实施例25

[0106] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.44g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1063。

[0107] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0108] 实施例26

[0109] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.44g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1337。

[0110] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0111] 实施例27

[0112] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.44g葡萄糖、5.6g大豆蛋白胨、1.4g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.8g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于

厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1407。

[0113] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0114] 实施例28

[0115] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.44g葡萄糖、6.4g大豆蛋白胨、1.6g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养的温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1400。

[0116] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0117] 实施例29

[0118] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.44g葡萄糖、4g大豆蛋白胨、1g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1.1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养的温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1143。

[0119] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0120] 实施例30

[0121] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.44g葡萄糖、4.8g大豆蛋白胨、1.2g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养的温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1043。

[0122] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0123] 实施例31

[0124] 取250ml规格的锥形瓶, 加入200mL纯水后, 再加入1.44g葡萄糖、5.6g大豆蛋白胨、1.4g苏氨酸、1.056g N-乙酰葡萄糖胺、0.9g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠, 充分搅拌混匀后, 对培养基进行高压灭菌, 待培养基冷却后, 向培养基中接种100μL嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液 (菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL) 和200μL半胱氨酸, 接种后置于厌氧箱 (85%CO₂, 10%N₂和5%H₂) 中培养 (培养温度为37℃) 3d后取出, 3000rpm离心10min, 观察沉淀菌量, 再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后, 使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值, OD₆₀₀值为0.1470。

[0125] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0126] 实施例32

[0127] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.44g葡萄糖、6.4g大豆蛋白胨、1.6g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量,再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值,OD₆₀₀值为0.1470。

[0128] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0129] 实施例33

[0130] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入1.44g葡萄糖、6.4g大豆蛋白胨、1.6g苏氨酸、1.056gN-乙酰葡萄糖胺、1g氯化钠和0.5g磷酸氢二钠,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量(结果如图4),再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值。三个平行实验,OD₆₀₀值分别为1.494、1.395和1.412。

[0131] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0132] 使用检验科尿液分析仪对菌液中的菌量进行计数,200 μ L的菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 8.8×10^9 cfu。

[0133] 使用荧光染料对嗜黏蛋白阿克曼氏菌进行荧光染色,具体操作如下:取试剂盒(LIVE/DEAD[®]BacLight[™] Bacterial Viability Kits)中的A,B染料各5 μ L混匀后避光待用,将Akk培养菌液使用无菌PBS做500倍稀释后,取混匀后的染料3 μ L加入到1mL的Akk稀释菌液中,充分震荡混匀,于室温避光孵育15min,然后取5 μ L染色活菌悬液于载玻片上,加盖玻片后在荧光显微镜下观察。结果如图5。从图5中可以得出,等量的Akk分别在本发明提供的培养基中培养后,能够得到比在黏蛋白培养基中培养时更多的活菌数,这表明本发明提供的培养基完全能够实现Akk的体外扩增培养,并且能够实现后续的功能性研究和产业化发展。

[0134] 对比例1

[0135] 取250ml规格的锥形瓶,加入200mL纯水后,再加入0.4g黏蛋白和7.4g脑心浸液干粉,充分搅拌混匀后,对培养基进行高压灭菌,待培养基冷却后,向培养基中接种100 μ L嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液(菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含量为 2.6×10^8 cfu/mL)和200 μ L半胱氨酸,接种后置于厌氧箱(85%CO₂,10%N₂和5%H₂)中培养(培养温度为37℃)3d后取出,3000rpm离心10min,观察沉淀菌量(结果如图4),再用5mL的无菌PBS重悬沉淀后,使用NanoDrop测定菌液的OD₆₀₀值。三个平行实验,OD₆₀₀值分别为0.915、0.945和0.976。

[0136] 菌液中的菌是否为嗜黏蛋白阿克曼氏菌以及该菌的纯度的检测同实施例1。

[0137] 使用检验科尿液分析仪对菌液中的菌量进行计数,200 μ L的菌液中嗜黏蛋白阿克曼氏菌的含菌量为 4.2×10^9 cfu。

[0138] 使用荧光染料对嗜黏蛋白阿克曼氏菌进行荧光染色,具体操作如下:取试剂盒(LIVE/DEAD[®]BacLight[™] Bacterial Viability Kits)中的A,B染料各5 μ L混匀后避光待用,将Akk培养菌液使用无菌PBS做500倍稀释后,取混匀后的染料3 μ L加入到1mL的Akk稀释菌液中,充分震荡混匀,于室温避光孵育15min,然后取5 μ L染色活菌悬液于载玻片上,加盖玻片后在荧光显微镜下观察。结果如图5。

[0139] 从图5中可以得出,等量的Akk分别在本发明提供的培养基中培养后,能够得到比在黏蛋白培养基中培养时更多的活菌数,这表明本发明提供的培养基完全能够实现Akk的体外扩增培养,并且能够实现后续的功能性研究和产业化发展。

[0140] 由以上实施例和对比例可以得出,采用本发明的培养基能够培养得到嗜黏蛋白阿克曼氏菌,培养基中的组分安全,不会存在潜在的风险,并且能够实现后续的功能性研究和产业化发展。

[0141] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

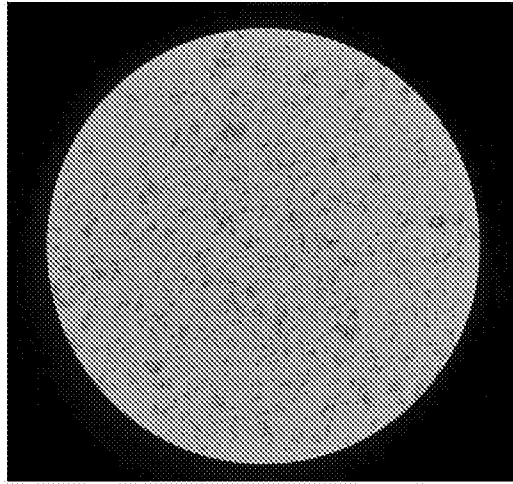


图1



图2

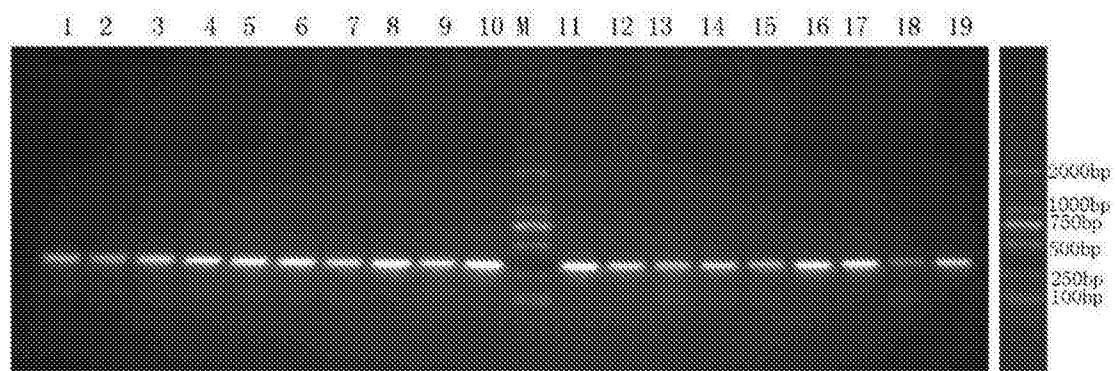


图3



图4

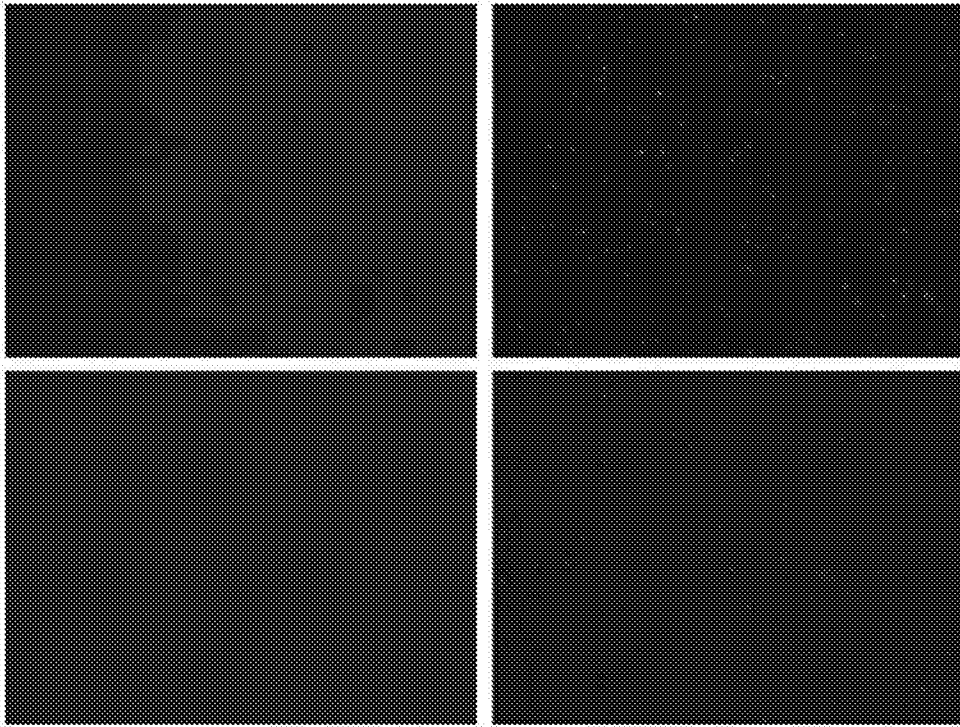


图5