



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111304133 A

(43)申请公布日 2020.06.19

(21)申请号 202010200526.X

(22)申请日 2020.03.20

(71)申请人 苏州普瑞森基因科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区

星湖街218号生物纳米园A5楼505单元

(72)发明人 朱永亮 宋伟群 朱浩

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋

(51) Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61K 35/74(2015.01)

A61P 3/00(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表1页 附图1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和应用

(57)摘要

本发明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和应用。所述培养基包括脑心浸液、猪胃黏蛋白、L-半胱氨酸盐酸盐、苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素。所述培养基中添加L-半胱氨酸盐酸盐、苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素,使得嗜黏蛋白阿克曼氏菌在含有浓度较低的脑心浸液和猪胃黏蛋白的培养基中仍然能够获得足够的营养物质,保证菌株的正常生长和繁殖。本发明提供的培养基培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌后,所得菌液的OD值为0.8211-0.8741。

Score	Expect	Identified	Query
1/55 (0.001818)	0.0	634/624 (100%)	0/624 (0%)
Query: 1	GCTTACTTCAAGCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 87	GACTTACTTCAAGCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 61	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 149	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 131	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 209	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 191	CTTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 269	CTTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 241	CAAGTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 329	CAAGTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 301	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 389	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 381	AGTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 469	AGTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Query: 491	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		
Subject: 599	TGTTTCTTCTTCAAGTCTTATGAGCTCTTCTTGGAGCTGCTAGTTCTTCAAGTCTGAG		

1. 一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,其特征在于,所述培养基包括脑心浸液、猪胃黏蛋白、L-半胱氨酸盐酸盐、苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素。

2. 根据权利要求1所述的培养基,其特征在于,所述培养基中包括浓度为25-40g/L脑心浸液、1.5-6g/L猪胃黏蛋白、0.1-5g/L L-半胱氨酸盐酸盐、1-10g/L苏氨酸、1-10g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖和质量分数为0.01-0.05%的维生素;

优选地,所述维生素包括维生素K₁;

优选地,所述培养基以水为溶剂。

3. 根据权利要求1或2所述的培养基,其特征在于,所述培养基中还包括微量元素;

优选地,所述微量元素包括锌、硼、铜、铁、钼、镍、锰或钴中的任意一种或两种以上的组合;

优选地,所述培养基中微量元素的含量为0.05-0.15g/L。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的培养基,其特征在于,含有所述微量元素的溶液包括氯化锌、硼酸、二水氯化铜、四水氯化亚铁、二水钼酸钠、六水氯化镍、四水氯化锰或六水氯化钴中的任意一种或两种以上的组合;

优选地,含有所述微量元素的溶液的配方为:

0.05-0.1g/L氯化锌、0.05-0.1g/L硼酸、0.01-0.02g/L二水氯化铜、1-2g/L四水氯化亚铁、0.02-0.03g/L二水钼酸钠、0.02-0.03g/L六水氯化镍、0.05-0.15g/L四水氯化锰和0.1-0.15g/L六水氯化钴。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的培养基,其特征在于,所述培养基还包括表面活性剂;

优选地,所述表面活性剂包括吐温-80;

优选地,所述表面活性剂的质量分数为0.01-0.02%。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的培养基,其特征在于,所述培养基中包括如下组分:

25-40g/L脑心浸液、1.5-5g/L猪胃黏蛋白、0.5-2g/L L-半胱氨酸盐酸盐、3-10g/L苏氨酸、3-10g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖、质量分数为0.01-0.02%维生素K₁、0.05-0.15g/L微量元素、质量分数为0.01-0.02%吐温-80;

进一步优选地,所述培养基中包括如下组分:

27-30g/L脑心浸液、2-2.5g/L猪胃黏蛋白、1.4-1.6g/L L-半胱氨酸盐酸盐、4-6g/L苏氨酸、4-6g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖、质量分数为0.014-0.016%的维生素K₁、0.08-0.12g/L微量元素、质量分数为0.014-0.016%的吐温-80。

7. 一种如权利要求1-6任一项所述的培养基的使用方法,其特征在于,所述使用方法包括如下步骤:

将嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液接种于如权利要求1-6任一项所述的培养基中,进行厌氧培养。

8. 根据权利要求7所述的使用方法,其特征在于,所述菌液的浓度为 $(0.8-1.2) \times 10^8$ cfu/mL;

优选地,所述菌液的接种量为100-200μL;

优选地,所述厌氧培养的温度为35-40℃;

优选地,所述厌氧培养的时间为72-96h。

9. 根据权利要求7或8所述的使用方法,其特征在于,所述使用方法包括如下步骤:

向权利要求1-7任一项所述的培养基中接种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液,所述菌液的浓度为 $(0.8-1.2) \times 10^8$ cfu/mL,接种量为100-200 μ L,然后在35-40 $^{\circ}$ C下进行厌氧培养72-96h。

10. 利用如权利要求1-6所述的培养基培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备治疗代谢性疾病的药物中的应用。

一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物培养基技术领域,具体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和应用。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*)简称Akk菌,是一种革兰氏阴性的严格厌氧球菌。2004年,德里安教授和她的团队在人体肠道中分离得到Akk菌,在人类消化道中普遍存在,约占比3-5%,可降解人体肠道中黏蛋白,它与肥胖、糖尿病、炎症和代谢紊乱呈负相关,具有延缓衰老、抑制神经退行性疾病、降脂减肥的作用。

[0003] 肠道中低水平的Akk菌可能导致黏膜层的变薄,从而导致肠道屏障功能减弱,使肠道内的毒素更容易侵入人体。因此,Akk菌是最近几年肠道微生物研究中的明星菌。同时,Akk菌存在一些改善身体各种病症的作用,有相当多的学者都将其视为下一代的益生菌,其作为主要成分的制剂必定具有广阔的发展前景和市场。

[0004] Akk菌合成培养基的优化是提高Akk菌产量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。

[0005] CN109810931A公开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。采用所述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。然而利用上述培养基虽然不添加牛脑心浸液琼脂干粉和猪胃黏蛋白仍然能够培养培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌,然而得到Akk菌的OD₆₀₀值仍然较低。

[0006] 因此,对于添加其他试剂是否更加有利于Akk菌的培养,以及降低牛脑心浸液干粉和猪胃黏蛋白的使用量,是否能达到较好的培养效果,鲜有报道。所以,开发一种利于Akk菌生长且成本较低的培养基是本领域亟需解决的问题。

发明内容

[0007] 鉴于现有技术中存在的问题,本发明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和应用,所述培养基由多成分组成,降低了牛脑心浸液干粉和猪胃黏蛋白的使用量,并通过筛选其他组分,科学配比,所得培养基能够达到更好的培养效果。

[0008] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 第一方面,本发明提供一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基,所述培养基包括脑心浸液、猪胃黏蛋白、L-半胱氨酸盐酸盐、苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素。

[0010] 所述培养基除脑心浸液和猪胃黏蛋白之外,还包括L-半胱氨酸盐酸盐、苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素。其中,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。苏氨酸、N-乙酰-D-氨基葡萄糖和维生素也能够提高

培养基中的碳氮含量,N-乙酰-D-氨基葡萄糖是生物体内许多重要多糖的基本组成单位,可以提供碳源,维生素作为一种生长因子,可以促进细菌的生长,均是维持菌株正常生长繁殖所需要的营养物质。

[0011] 作为本发明优选的技术方案,所述培养基中包括浓度为25-40g/L脑心浸液、1.5-6g/L猪胃黏蛋白、0.1-5g/L L-半胱氨酸盐酸盐、1-10g/L苏氨酸、1-10g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖和质量分数为0.01-0.05%的维生素,其中质量分数表示维生素与培养基总质量的比值。

[0012] 所述培养基中各组分的浓度在上述范围中时,用于培养Akk菌效果较好,若是低于所述最低浓度,则可能导致培养基营养不足,若是高于最高浓度,则导致Akk菌生长与繁殖不协调,导致生长情况不良。为了使菌株能正常生长发育,培养基除了必须有足够的碳、氮营养外,还应注意碳与氮的比例,这样既能保证营养生长阶段对营养的需要,也能保证生殖生长的顺利进行。

[0013] 本发明中,所述培养基中脑心浸液的质量浓度为25-40g/L,例如可以是25g/L、26g/L、28g/L、30g/L、32g/L、35g/L、36g/L、38g/L或40g/L等。

[0014] 所述培养基中猪胃黏蛋白的质量浓度为0.5-2g/L,例如可以是0.5g/L、0.6g/L、0.8g/L、1g/L、1.2g/L、1.4g/L、1.5g/L、1.6g/L、1.8g/L或2g/L等。

[0015] 所述培养基中L-半胱氨酸盐酸盐的质量浓度为0.1-5g/L,例如可以是0.1g/L、0.5g/L、1g/L、1.2g/L、1.5g/L、1.8g/L、2g/L、2.4g/L、3g/L、3.5g/L、4g/L、5.5g/L或5g/L等。

[0016] 所述培养基中苏氨酸的质量浓度为1-10g/L,例如可以是1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L或10g/L等。

[0017] 所述培养基中N-乙酰-D-氨基葡萄糖的质量浓度为1-10g/L,例如可以是1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L或10g/L等。

[0018] 所述培养基中维生素的质量分数为0.01-0.05%,例如可以是0.01%、0.012%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%、0.035%、0.04%、0.045%或0.05%等。

[0019] 优选地,所述维生素包括维生素K₁。

[0020] 优选地,所述培养基以水为溶剂。

[0021] 作为本发明优选的技术方案,所述培养基中还包括微量元素。

[0022] 优选地,所述微量元素包括锌、硼、铜、铁、钼、镍、锰或钴中的任意一种或两种以上的组合。

[0023] 优选地,所述培养基中微量元素的含量为0.05-0.15g/L,例如可以是0.06g/L、0.07g/L、0.08g/L、0.09g/L、0.1g/L、0.12g/L、0.14g/L或0.15g/L等。

[0024] 通过添加上述微量元素,能够进一步提高Akk菌的生存活力,使其在培养时生长更加具有优势。

[0025] 作为本发明优选的技术方案,含有所述微量元素的溶液包括氯化锌(ZnCl₂)、硼酸(H₃BO₃)、二水氯化铜(CuCl₂·2H₂O)、四水氯化亚铁(FeCl₂·4H₂O)、二水钼酸钠(Na₂MoO₄·2H₂O)、六水氯化镍(NiCl₂·6H₂O)、四水氯化锰(MnCl₂·4H₂O)或六水氯化钴(CoCl₂·6H₂O)中的任意一种或两种以上的组合。

[0026] 优选地,含有所述微量元素的溶液的配方为0.05-0.1g/L(例如可以是0.05g/L、0.06g/L、0.07g/L、0.08g/L、0.09g/L或0.1g/L等)氯化锌、0.05-0.1g/L(例如可以是0.05g/L、

L、0.06g/L、0.07g/L、0.08g/L、0.09g/L或0.1g/L等) 硼酸、0.01-0.02g/L (例如可以是0.01g/L、0.012g/L、0.014g/L、0.016g/L、0.018g/L或0.02g/L等) 二水氯化铜、1-2g/L (例如可以是1g/L、1.2g/L、1.4g/L、1.6g/L、1.8g/L或2g/L等) 四水氯化亚铁、0.02-0.03g/L (例如可以是0.02g/L、0.022g/L、0.024g/L、0.026g/L、0.028g/L或0.03g/L等) 二水钼酸钠、0.02-0.03g/L (例如可以是0.02g/L、0.022g/L、0.024g/L、0.026g/L、0.028g/L或0.03g/L等) 六水氯化镍、0.05-0.15g/L (例如可以是0.05g/L、0.07g/L、0.08g/L、0.1g/L、0.12g/L或0.15g/L等) 四水氯化锰和0.1-0.15g/L六水氯化钴。

[0027] 优选地, 含有所述微量元素的溶液的配方为: 0.07g/L氯化锌、0.06g/L硼酸、0.015g/L二水氯化铜、1.5g/L四水氯化亚铁、0.025g/L二水钼酸钠、0.025g/L六水氯化镍、0.1g/L四水氯化锰和0.12g/L六水氯化钴。

[0028] 作为本发明优选的技术方案, 所述培养基还包括表面活性剂。

[0029] 优选地, 所述表面活性剂包括吐温-80。吐温-80是一种很好的乳化剂和分散剂, 能够使得培养基中的营养成分更加的均匀。

[0030] 优选地, 所述表面活性剂的质量分数(表面活性剂与培养基总重量的比值)为0.01-0.02%, 例如可以是0.01%、0.012%、0.014%、0.015%、0.016%、0.017%、0.018%、0.019%或0.02%等。

[0031] 作为本发明优选的技术方案, 所述培养基中各组分的含量为:

[0032] 25-40g/L脑心浸液、1.5-5g/L猪胃黏蛋白、0.5-2g/L L-半胱氨酸盐酸盐、3-10g/L苏氨酸、3-10g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖、质量分数为0.01-0.02%维生素K₁、0.05-0.15g/L微量元素、质量分数为0.01-0.02%吐温-80。

[0033] 优选地, 所述培养基中各组分的含量为: 27-30g/L脑心浸液、2-2.5g/L猪胃黏蛋白、1.4-1.6g/L L-半胱氨酸盐酸盐、4-6g/L苏氨酸、质量分数为0.014-0.016%的维生素K₁、4-6g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.08-0.12g/L微量元素、质量分数为0.014-0.016%的吐温-80。

[0034] 例如, 所述培养基中各组分的含量可以为29.6g/L脑心浸液、1.152g/L猪胃黏蛋白、1.5g/L L-半胱氨酸盐酸盐、5g/L苏氨酸、质量分数为0.015%的维生素K₁、5g/L N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.1g/L微量元素、质量分数为0.015%的吐温-80。

[0035] 第二方面, 本发明提供一种如第一方面的培养基的使用方法, 所述使用方法包括如下步骤:

[0036] 将嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液接种于如第一方面所述的培养基中, 进行厌氧培养。

[0037] 本发明中, 所述嗜黏蛋白阿克曼氏菌粪便中提取分离得到, 具体步骤如下:

[0038] (1) 样品处理: 取250mL的锥形瓶中, 放入150mL的生理盐水溶液, 封口, 和本发明所述的培养基一起放入高压灭菌锅中, 121℃灭菌20分钟, 取出, 放凉。加入25g正常健康人的粪便, 摇匀, 过滤除去不溶物, 进行梯度稀释, 选10⁻³到10⁻⁹七个梯度, 3000r/min离心, 待培养基冷却到55℃, 往平板中倒入15-20mL的培养基, 再分别用移液枪取0.2mL注入含有培养基的平板中, 涂布均匀, 凝固后倒置于37℃含有厌氧产气袋的密闭容器中进行培养。

[0039] (2) 分离培养: 37℃培养2周后, 进行菌落形态学的观察、进行革兰氏染色镜检, 从固体培养基平板上挑选周围无杂质、直径1mm、乳白色的菌落, 然后取0.2mL菌液再接着涂平

板,一直筛选到平板上只有一种菌为止,所得菌株即为嗜黏蛋白阿克曼氏菌。

[0040] 作为本发明优选的技术方案,所述菌液的浓度为 $(0.8-1.2) \times 10^8$ cfu/mL,例如可以是 0.8×10^8 cfu/mL、 0.85×10^8 cfu/mL、 0.9×10^8 cfu/mL、 0.95×10^8 cfu/mL、 1×10^8 cfu/mL、 1.05×10^8 cfu/mL、 1.1×10^8 cfu/mL或 1.2×10^8 cfu/mL等。

[0041] 优选地,所述菌液的接种量为100-200 μ L,例如可以是110 μ L、120 μ L、130 μ L、140 μ L、150 μ L、160 μ L、170 μ L、180 μ L、190 μ L或200 μ L等。

[0042] 优选地,所述厌氧培养的温度为35-40 $^{\circ}$ C,例如可以是35 $^{\circ}$ C、36 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、38 $^{\circ}$ C、39 $^{\circ}$ C或40 $^{\circ}$ C等。

[0043] 优选地,所述厌氧培养的时间为72-96h,例如可以是72h、75h、78h、80h、82h、85h、88h、90h、92h、94h或96h等。

[0044] 作为本发明优选的技术方案,所述使用方法包括如下步骤:向第一方面所述的培养基中接种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的菌液,所述菌液的浓度为 $(0.8-1.2) \times 10^8$ cfu/mL,接种量为100-200 μ L,而后在35-40 $^{\circ}$ C下进行厌氧培养72-96h。

[0045] 第三方面,本发明还提供一种利用如第一方面所述的培养基培养得到的嗜黏蛋白阿克曼氏菌在制备治疗代谢性疾病的药物中的应用。

[0046] 本发明所述的数值范围不仅包括上述例举的点值,还包括没有列举出的上述数值范围之间的任意的点值,限于篇幅及出于简明的考虑,本发明不再穷尽列举所述范围包括的具体点值。

[0047] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0048] (1) 本发明提供的培养基包括脑心浸液、猪胃黏蛋白、L-半胱氨酸盐酸盐、维生素K₁、苏氨酸和N-乙酰-D-氨基葡萄糖,所述培养基能够为Akk菌的生长繁殖提供所需的营养元素,同时,通过进一步添加微量元素和吐温-80试剂,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。

[0049] (2) 本发明提供的培养基通过合适的培养方法培养Akk菌后,所得菌株的OD值为0.8211-0.8741,并且本发明通过PCR技术鉴定了培养基中的菌株确为Akk菌,因此,本发明提供的培养基有利于Akk菌的培养,便于后期将Akk菌制成制剂,并且能够实现后续的功能性研究和产业化发展。

附图说明

[0050] 图1是实施例1中所培养的Akk菌与数据库中标准Akk菌的DNA序列对比图。

具体实施方式

[0051] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但下述的实例仅仅是本发明的简易例子,并不代表或限制本发明的权利保护范围,本发明的保护范围以权利要求书为准。

[0052] 以下实施例中,所用菌株及实验试剂均购自常规厂家,具体来源如下表1所示:

[0053] 表1

[0054]	实验菌株或试剂	公司
	生理盐水	广州瑞舒生物试剂有限公司

脑心浸液	Solarbio
猪胃黏蛋白	SIGMA
苏氨酸	上海生工生物工程有限公司
N-乙酰-D-氨基葡萄糖	上海生工生物工程有限公司
乙醇	上海国药集团
吐温-80	上海生工生物工程有限公司
Fast pfu DNA聚合酶kit	北京全式金生物技术有限公司
引物	上海生工生物工程有限公司
ZnCl ₂	天津致远化学试剂有限公司
H ₃ BO ₃	天津致远化学试剂有限公司
CuCl ₂ • 2H ₂ O	天津致远化学试剂有限公司
FeCl ₂ • 4H ₂ O	天津致远化学试剂有限公司
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	天津致远化学试剂有限公司
NiCl ₂ • 6H ₂ O	上海国药集团
MnCl ₂ • 4H ₂ O	天津致远化学试剂有限公司
CoCl ₂ • 6H ₂ O	天津致远化学试剂有限公司

[0055] 以下实施例中,所述微量元素的配方如下表2所示:

[0056] 表2

[0057]

化学成分	含量(g/L)
ZnCl ₂	0.07
H ₃ BO ₃	0.06
CuCl ₂ • 2H ₂ O	0.015
FeCl ₂ • 4H ₂ O	1.5
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.025
NiCl ₂ • 6H ₂ O	0.025
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.1
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.12

[0058] 以下实施例中,所述实验仪器的来源如下表3所示:

[0059] 表3

[0060]

实验仪器	公司
磁力搅拌器	杭州米欧仪器有限公司
电子天平	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
高速离心机	ThermoFisher
立式高压蒸汽灭菌器	上海申安医疗器械厂
酶标仪	郑州安图生物工程有限公司

[0061] 实施例1

[0062] 本实施例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0063] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸、质量分数为0.015%维生素K₁、1.0g N-乙酰-D-氨基葡萄糖,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转

移到锥形瓶中,灭菌。

[0064] 实施例2

[0065] 本实施例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0066] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸、质量分数为0.015%的维生素K₁、1.0g N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.1mL微量元素,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0067] 实施例3

[0068] 本实施例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0069] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸、质量分数为0.015%维生素K₁、1.0g N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.1mL微量元素、质量分数为0.015%的吐温-80,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0070] 实施例4

[0071] 本实施例提供一种培养基,与实施例3的区别仅在于猪胃黏蛋白的质量为0.48g。

[0072] 实施例5

[0073] 本实施例提供一种培养基,与实施例3的区别仅在于猪胃黏蛋白的质量为0.4g。

[0074] 实施例6

[0075] 本实施例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0076] 7.4g脑心浸液、0.4g猪胃黏蛋白、0.45g L-半胱氨酸盐酸盐、1.5g苏氨酸、质量分数为0.02%的维生素K₁、1.5g N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.15mL微量元素、质量分数为0.02%的吐温-80,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0077] 实施例7

[0078] 本实施例提供一种培养基,与实施例3的区别在于:脑心浸液的质量为5.92g,猪胃黏蛋白的质量为0.48g。

[0079] 实施例8

[0080] 本实施例提供一种培养基,与实施例3的区别在于:脑心浸液的质量为5.5g,猪胃黏蛋白的质量为0.48g。

[0081] 实施例9

[0082] 与实施例3的区别在于,所述培养基中L-半胱氨酸盐酸盐的质量为1g。

[0083] 实施例10

[0084] 与实施例3的区别在于,所述培养基中L-半胱氨酸盐酸盐的质量为0.1g。

[0085] 实施例11

[0086] 与实施例3的区别在于,所述培养基中苏氨酸的质量为2g。

[0087] 实施例12

[0088] 与实施例3的区别在于,所述培养基中苏氨酸的质量为0.5g。

[0089] 实施例13

[0090] 与实施例3的区别在于,所述培养基维生素K₁的质量分数为0.05%。

[0091] 实施例14

[0092] 与实施例3的区别在于,所述培养基中N-乙酰-D-氨基葡萄糖的质量为2g。

[0093] 对比例1

[0094] 本对比例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0095] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0096] 对比例2

[0097] 本对比例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0098] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0099] 对比例3

[0100] 本对比例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0101] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0102] 对比例4

[0103] 本对比例提供一种培养基,所述培养基包括:

[0104] 7.4g脑心浸液、0.8g猪胃黏蛋白、0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸、0.2mL维生素K₁,加水定容至200mL,搅拌30min混匀后,转移到锥形瓶中,灭菌。

[0105] 对比例5

[0106] 与实施例3的区别在于,所述培养基中将L-半胱氨酸盐酸盐替换为赖氨酸盐酸盐。

[0107] 对比例6

[0108] 与实施例3的区别在于,所述培养基中将N-乙酰-D-氨基葡萄糖替换为葡萄糖。

[0109] 对比例7

[0110] 与实施例3的区别在于,所述培养基中将微量元素替换为单一的铁元素。

[0111] 性能测试

[0112] 使用实施例1-16和对比例1-7提供的培养基培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌。

[0113] 1.0D值检测

[0114] 将培养基高温灭菌并冷却后,向培养基中接种嗜黏蛋白阿克曼氏菌液(1×10^8 cfu/mL、200 μ L),接种后置于封闭的容器,同时放入两个厌氧产气袋,在37℃下进行培养,4d后取出,3000rpm离心10min,再用2mL的无菌PBS重悬沉淀后,加入到96孔板中,每孔200 μ L,PBS为空白对照。

[0115] 使用酶标仪于630nm处,测定菌液的OD值,重复测三次,取平均值,所得结果如表4所示。

[0116] 表4

[0117]

样品	OD 值
实施例 1	0.8421
实施例 2	0.8558
实施例 3	0.8622
实施例 4	0.8677
实施例 5	0.8374
实施例 6	0.8211
实施例 7	0.8741
实施例 8	0.8273
实施例 9	0.8531
实施例 10	0.8209
实施例 11	0.8437
实施例 12	0.8339
实施例 13	0.8340

[0118]

实施例 14	0.8514
对比例 1	0.7627
对比例 2	0.7951
对比例 3	0.8144
对比例 4	0.8159
对比例 5	0.8163
对比例 6	0.8201
对比例 7	0.8092

[0119] 由上表可知,本发明提供的Akk菌培养基均能使菌株正常生长,其OD值均大于0.82;且实施例3、4和5可知,当单独改变猪胃黏蛋白含量时,猪胃黏蛋白的质量为0.48g培养效果最佳;由实施例4、7和8可知,当单独改变脑心浸液含量时,脑心浸液含量为5.92时培养效果最佳。

[0120] 由上表可知,本发明中制备得到的培养基最优方案为:5.92g脑心浸液,0.48g猪胃黏蛋白,0.3g L-半胱氨酸盐酸盐、1.0g苏氨酸、0.2mL维生素K₁、1.0g N-乙酰-D-氨基葡萄糖、0.1mL微量元素、0.1mL吐温-80,加水定容至200mL。

[0121] 2.黏蛋白的纯化

[0122] 黏蛋白中杂质较多,不纯化培养基的会浑浊、不透明,而纯化后能够去除杂质,培养基透明、不浑浊。

[0123] 取黏蛋白溶解于水中,于30-35℃搅拌5h,得到混合液;将混合液在3000rpm离心10min,取上清,加入乙醇,后静置4h,去上清,得到沉淀用水溶解,重复用乙醇洗涤纯化2次后,沉淀用水溶解,即得到纯化后的黏蛋白。

[0124] 3.培养基中菌株种类的确认

[0125] 将培养好的AKK菌DNA提取出来,使用nanodrop 2000检测DNA浓度,取5μL DNA使用如下引物扩增AKK菌DNA序列:

[0126] 上游引物(SEQ ID NO.1):CAAGTCGAACGAGAGAATTGCTAGC,

[0127] 下游引物(SEQ ID NO.2):CATCCCAGTTACCAGTCTCACCTT。

[0128] PCR反应体系如下表5所示:

[0129] 表5

[0130]

试剂	含量(μL)
Fast pfu DNA聚合酶	1
5X Fast pfu buffer	10
dNTP (2.5mM)	2
AKK上游引物 (10μM)	2
AKK下游引物 (10μM)	2
AKK菌DNA (34ng/μL)	5
3dH ₂ O	28
总体积	50

[0131] PCR反应条件如下表6所示:

[0132] 表6

[0133]	温度	时间	
	95℃	5 min	
	95℃	30 sec	35 个循环
	65℃	30 sec	
	72℃	2 min	
[0134]	72℃	7 min	
	4℃	10 min	

[0135] 取5 μ L总PCR产物加入1 μ L DNA loading buffer,使用1%琼脂糖凝胶进行电泳,采用Chemi Doc XRS+成像仪收集图片,剩余PCR产物,送至上海生工生物工程有限公司使用上游引物测序,所得序列为SEQ ID NO.3,将所得结果使用NCBI的BLAST程序进行比对,测序结果得知与NCBI中Akk菌的数据比较结果如图1所示,数据相似度为100%,证明培养得到的菌株均为Akk菌。

[0136] 综上所述,本发明提供的培养基能够为Akk菌的生长繁殖提供所需的营养元素,能够得到比在黏蛋白培养基中培养时更多的活菌数,完全实现了Akk菌的体外扩充培养,且培养效果较好,培养成本较低。

[0137] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细结构特征,但本发明并不局限于上述详细结构特征,即不意味着本发明必须依赖上述详细结构特征才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用部件的等效替换以及辅助部件的增加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 苏州普瑞森基因科技有限公司

<120> 一种培养嗜黏蛋白阿克曼氏菌的培养基及其使用方法和应用

<130> 20200313

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 1

caagtcgaac gagagaattg ctage 25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

catcccagtt accagtctca cctt 24

<210> 3

<211> 480

<212> DNA

<213> Akkermansia muciniphila

<400> 3

gggtgagtaa cacgtgagta acctgcccc cagagcggga tagccctggg aaactgggat 60
taataaccgca tagtatcgaa agattaaagc agcaatgcgc ttggggatgg gctcgcggcc 120
tattagttag ttggtgaggt aacggctcac caaggcgatg acgggtagcc ggtctgagag 180
gatgtccggc cacactggaa ctgagacacg gtccagacac ctacgggtgg cagcagtcga 240
gaatcattca caatggggga aaccctgatg gtgcgacgcc gcgtggggga atgaaggtct 300
tcggattgta aaccctgtc atgtgggagc aaattaaaaa gatagtacca caagaggaa 360
agacggctaa ctctgtgcca gcagccgcgg taatacagag gtctcaagcg ttgttcggaa 420
tcaactgggcg taaagcgtgc gtaggctgtt tcgtaagtcg tgtgtgaaag gcgcgggctc 480

Score	Expect	Identities	Gaps
1153 bits(624)	0.0	624/624(100%)	0/624(0%)
Query 1	GGGTGAGTAACAAGTGAAGTAACTGCCCCGAGAGCGGATAGCCCTGGGAAACTGGGAT		
Sbjct 87	GGGTGAGTAACAAGTGAAGTAACTGCCCCGAGAGCGGATAGCCCTGGGAAACTGGGAT		
Query 61	TAATAACCCATAGTATCGAAAGATTAAAGCAGCAATGCGCTTGGGGATGGGCTGGGGCC		
Sbjct 147	TAATAACCCATAGTATCGAAAGATTAAAGCAGCAATGCGCTTGGGGATGGGCTGGGGCC		
Query 121	TATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGCGATGACGGGTAGCCGTCTGAGAG		
Sbjct 207	TATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAAGCGATGACGGGTAGCCGTCTGAGAG		
Query 181	GATGTCCGGCCACTGGAAGTGAAGACACCGTCCAGACACCTACGGGTGGCAGCAGTCGA		
Sbjct 267	GATGTCCGGCCACTGGAAGTGAAGACACCGTCCAGACACCTACGGGTGGCAGCAGTCGA		
Query 241	GAATCATTACAATGGGGAAACCGTGATGCTGGGACGCCCGGTGGGGGAATGAAGGTCT		
Sbjct 327	GAATCATTACAATGGGGAAACCGTGATGCTGGGACGCCCGGTGGGGGAATGAAGGTCT		
Query 301	TCGGATTGTAAAACCGTGTCTGTGGGAGCAAATTAAGAGATAGTACCACAAGAGGAAG		
Sbjct 387	TCGGATTGTAAAACCGTGTCTGTGGGAGCAAATTAAGAGATAGTACCACAAGAGGAAG		
Query 361	AGACCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAAATACAGAGGTCTCAAGCGTTGTTCCGAA		
Sbjct 447	AGACCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAAATACAGAGGTCTCAAGCGTTGTTCCGAA		
Query 421	TCACTGGCGTAAAGCGTGGTAGGCTGTTTGGTAAGTCGTGTGAAAAGCGCGCGGCTC		
Sbjct 507	TCACTGGCGTAAAGCGTGGTAGGCTGTTTGGTAAGTCGTGTGAAAAGCGCGCGGCTC		

图1