



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112342151 A

(43)申请公布日 2021.02.09

(21)申请号 201910721005.6

(22)申请日 2019.08.06

(71)申请人 君维安(武汉)生命科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号生物创新园C4栋
505室

(72)发明人 王敏 石长萍

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

代理人 徐瑛

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

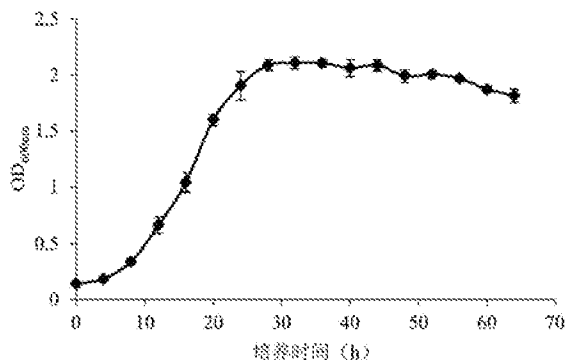
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法

(57)摘要

本发明属于微生物培养技术领域,具体公开了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,所述厌氧培养采用的混合气体配比为85~94% N₂、5% H₂、1~10% CO₂,采用的培养基为改良BHI培养基,所述改良BHI培养基中添加有Mucin和Yeast Extract。本发明的培养基和培养条件的配合使得Akk菌的生长繁殖不受液面高低限制,既可以在摇瓶中良好生长,也可以在平板表面良好生长,降低了Akk菌的培养难度,同时使得Akk菌的生长速度由现有技术的3~4d降为24~36h,极大的缩短了培养时间,提高了Akk菌的活性并促进了Akk菌的生长,对Akk菌的扩大化培养和深入研究具有重要意义。



1. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的混合气体配比为85~94% N_2 、5% H_2 、1~10% CO_2 。

2. 如权利要求1所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的混合气体配比88~92% N_2 、5% H_2 、3~7% CO_2 。

3. 如权利要求1或2所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的混合气体配比为90% N_2 、5% H_2 、5% CO_2 。

4. 如权利要求1所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的培养基为改良BHI培养基,所述改良BHI培养基中添加有Mucin和Yeast Extract。

5. 如权利要求4所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述改良BHI培养基的配方为:Brain-heart Infusion Extract37g/L、Yeast Extract5g/L、Mucin2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L。

6. 如权利要求5所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述改良BHI培养基配制方法为:

S1、Mucin溶液的配制:将Mucin溶于PBS缓冲液,浓度为1% (W/V),灭菌、静置过夜,12000rpm离心5min,取上清备用;

S2、L-半胱氨酸盐酸盐溶液的配制:将L-半胱氨酸盐酸盐溶解于超纯水,得到10% (W/V)的L-半胱氨酸盐酸盐溶液,过滤除菌备用;

S3、向1L水中加入Brain-heart Infusion Extract37g、Yeast Extract5g、0.1% (W/V)刃天青1mL,混合均匀后,高压灭菌处理,然后取375mL灭菌液加入125mL步骤S1的Mucin溶液,混合均匀后加入10mL步骤S2的L-cysteine hydrochloride溶液,得改良BHI培养基。

7. 如权利要求1所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的培养温度为37℃。

8. 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述厌氧培养采用的混合气体配比为95% N_2 、5% H_2 ;采用的培养基为改良BHI培养基,所述改良BHI培养基中添加有Mucin、Yeast Extract以及0.7~7mM $NaHCO_3$ 。

9. 如权利要求8所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述改良BHI培养基的配方为:Brain-heart Infusion Extract37g/L、Yeast Extract5g/L、Mucin2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L、 $NaHCO_3$ 0.7~7mM。

10. 如权利要求8或9所述的嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,其特征在于,所述 $NaHCO_3$ 浓度为3.5mM。

一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物培养技术领域,具体涉及一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 (*Akkermansia muciniphila*, 以下简称Akk) 于2004年由Derrien M等人首次分离成功,属于疣微菌门,革兰氏阴性,严格厌氧,能以粘蛋白作为其唯一的碳源、氮源和能源物质。近年来研究表明,Akk和人类的许多代谢疾病有一定的关联,其含量是衡量肠道微生态是否平衡的重要标志微生物之一,Akk的丰度与人类的体重、I型糖尿病和II型糖尿病成负相关,同时与腰围,体重和体质指数呈负相关,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,其培养显得尤为重要。但是,由于Akk对生长的营养需求及其对氧的敏感性和较低的氧化还原电势使该细菌的培养并非容易地。

[0003] Derrien M等人 (Derrien M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov. sp. nov. a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54.) 公开了在嗜黏蛋白阿克曼氏菌可在含有猪胃粘蛋白作为唯一碳源和氮源的基础厌氧培养基上生长,且其培养气氛为 N_2/CO_2 (80:20, v/v);发明人在利用上述培养条件以及常规的厌氧箱培养条件 (95% N_2 、5% H_2) 进行摇瓶培养时,发现Akk生长受液面高低限制,初始培养的液面高度不能低于2cm。另有中国专利号CN201910265701.0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,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85% CO_2 、10% N_2 和5% H_2 的厌氧条件下进行培养,但是在上述专利的培养条件下,黏蛋白阿克曼氏菌的生长缓慢,菌活性较低,需要培养3~4d甚至更久,相对是菌丰度也较低,这使得对它的深入研究有一定的困难,不利于研究工作的开展。

发明内容

[0004] 针对现有技术所存在的上述缺点,本发明提供了一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法。

[0005] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,所述厌氧培养采用的混合气体配比为85~94% N_2 、5% H_2 、1~10% CO_2 。 CO_2 除具有促进Akk生长繁殖的作用,还可以溶解在培养基中形成碳酸,使无机碳浓度增加,维持培养基适宜的pH值,因此 CO_2 的浓度不宜过高或过低,过高pH值下降较快,过低则pH值较高,都不适宜Akk生长繁殖。

[0006] 进一步的,所述厌氧培养采用的混合气体配比88~92% N_2 、5% H_2 、3~7% CO_2 。

[0007] 进一步的,所述厌氧培养采用的混合气体配比为90% N_2 、5% H_2 、5% CO_2 。

[0008] 进一步的,所述厌氧培养采用的培养基为改良BHI培养基,所述改良BHI培养基中添加有Mucin(黏蛋白)和Yeast Extract(酵母提取物)。

[0009] 进一步的,所述改良BHI培养基的配方(g/L)为:Brain-heart Infusion Extract

37g/L、Yeast Exctact 5g/L、Mucin 2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L。

[0010] 进一步的,所述改良BHI培养基配制方法为:

[0011] S1、Mucin溶液的配制:将Mucin溶于PBS缓冲液,浓度为1% (W/V),灭菌、静置过夜,12000rpm离心5min,取上清备用;

[0012] S2、L-半胱氨酸盐酸盐溶液的配制:将L-半胱氨酸盐酸盐溶解于超纯水,得到10% (W/V)的L-半胱氨酸盐酸盐溶液,过滤除菌备用;

[0013] S3、向1L水中加入Brain-heart Infusion Extract 37g,Yeast Exctact 5g,0.1% (W/V) 刃天青1mL,混合均匀后,高压灭菌处理,然后取375mL灭菌液加入125mL步骤S1的Mucin溶液,混合均匀后加入10mL步骤S2的L-cysteine hydrochloride溶液,得改良BHI培养基。

[0014] 进一步的,所述厌氧培养采用的培养温度为37℃。

[0015] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,所述厌氧培养采用的混合气体配比为95%N₂、5%H₂;采用的培养基为改良BHI培养基,所述改良BHI培养基中添加有Mucin、Yeast Exctact以及0.7~7mM NaHCO₃。NaHCO₃作为CO₂来源,可以起到在厌氧培养中补充CO₂的作用。

[0016] 进一步的,所述改良BHI培养基的配方(g/L)为:Brain-heart Infusion Extract 37g/L、Yeast Exctact 5g/L、Mucin 2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L、NaHCO₃ 0.7~7mM。

[0017] 进一步的,所述NaHCO₃浓度为3.5mM。

[0018] 采用本发明提供的技术方案,具有如下有益效果:

[0019] 1、本发明的培养基和培养条件的配合使得Akk菌的生长繁殖不受液面高低限制,既可以在摇瓶中良好生长,也可以在平板表面良好生长,降低了Akk菌的培养难度,同时使得Akk菌的生长速度由现有技术的3~4d降为24~36h,极大的缩短了培养时间,提高了Akk菌的活性并促进了Akk菌的生长,对Akk菌的扩大化培养和深入研究具有重要意义。

[0020] 2、采用本发明的培养方法,可以使得不需采用倾注法或者穿刺培养形成一定的液面深度,而可以使用平板划线或者涂布法,在固体培养基表面就可形成典型的菌落形态,对于Akk菌的筛选来说十分方便,适用于菌种的筛选分离培养。

附图说明

[0021] 图1是实施例3厌氧培养混合气体优化的摇瓶培养图;其中,A:厌氧体系A,95%N₂、5%H₂;B:厌氧体系B,80%N₂、20%CO₂;C:厌氧体系C,90%N₂、5%H₂、5%CO₂;

[0022] 图2是实施例3厌氧培养混合气体优化的平板培养图;其中,A:厌氧体系A,95%N₂、5%H₂;B:厌氧体系B,80%N₂、20%CO₂;C:厌氧体系C,90%N₂、5%H₂、5%CO₂;

[0023] 图3是实施例6的菌落形态图;

[0024] 图4是实施例6的结晶紫染色图;

[0025] 图5是实施例6的PCR扩增图;其中,CK1:空白对照,CK2:阳性对照,Akk1:菌液作为PCR模板,Akk2:单菌落作为PCR模板,M:Marker;

[0026] 图6是实施例6的生长曲线图。

具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明中的附图,对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动条件下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 实施例1 Akk菌的厌氧培养方法

[0029] 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法,取Akk单菌落过夜活化,按1%的接种量接种到改良BHI培养基中,在85~94%N₂、5%H₂、1~10%CO₂厌氧条件下,37℃恒温培养。

[0030] 所述改良BHI培养基的配方为:Brain-heart Infusion Extract 37g/L、Yeast Exctact 5g/L、Mucin 2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L。

[0031] 所述改良BHI培养基配制方法为:

[0032] S1、Mucin溶液的配制:将Mucin溶于PBS缓冲液,浓度为1% (W/V),灭菌、静置过夜,12000rpm离心5min,取上清备用;本实施例具体为:称取1.25g Mucin,溶于125mL PBS (pH7.4),灭菌、静置过夜,12000rpm离心5min,取上清备用;

[0033] S2、L-半胱氨酸盐酸盐溶液的配制:将L-半胱氨酸盐酸盐溶解于超纯水,得到10% (W/V)的L-半胱氨酸盐酸盐溶液,过滤除菌备用;

[0034] S3、向1L水中加入Brain-heart Infusion Extract 37g,Yeast Exctact 5g,0.1% (W/V) 刃天青1mL,混合均匀后,高压灭菌处理,然后取375mL灭菌液加入125mL步骤S1的Mucin溶液,混合均匀后加入10mL步骤S2的L-cysteine hydrochloride溶液,得改良BHI培养基。

[0035] 本发明的嗜黏蛋白阿克曼氏菌为Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835,购自中国典型培养物保藏中心。

[0036] 实施例2培养基优化

[0037] 取Akk菌单菌落过夜活化,按1%的接种量分别接种到1mL不同培养基中(培养基A和B),在90%N₂、5%H₂、5%CO₂的厌氧条件下,37℃恒温培养24h,取样6000r/min离心5min,弃上清,用灭菌的PBS洗涤沉淀菌体2次,最后用PBS重悬菌体,通过分光光度计在600nm波长下测定菌浓度OD_{600nm},具体结果见表1。

[0038] 培养基A:Brain-heart Infusion Extract 37g/L、Mucin 2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L;

[0039] 培养基B(改良BHI培养基):Brain-heart Infusion Extract 37g/L、Yeast Exctact 5g/L、Mucin 2.5g/L、刃天青1mg/L、L-半胱氨酸盐酸盐100mg/L。

[0040] 表1不同培养基对Akk菌生长的影响

[0041]

培养条件	菌浓度
培养基A	0.80
培养基B	1.345

[0042] 由表1可知,Akk菌在添加Yeast Exctact的BHI培养基中的生长速度较不添加组快,且菌液浊度也较高,说明Yeast Exctact促进了菌株的生长繁殖。因此,除非特别说明,本发明皆采用培养基B作为嗜黏蛋白阿克曼氏菌的最优培养基。

[0043] 实施例3厌氧培养混合气体优化

[0044] 取Akk菌单菌落过夜活化,按1%的接种量接种到1mL改良BHI培养基,分别置于下述混合气体的厌氧体系(厌氧体系A:95%N₂、5%H₂;厌氧体系B:80%N₂、20%CO₂;厌氧体系C:90%N₂、5%H₂、5%CO₂;)下进行培养,37℃恒温培养24h,另将活化好的菌液划线于改良BHI固体培养基,37℃倒置培养24-48h,记录菌的生长情况;摇瓶培养和平板培养结果分别见图1和图2。

[0045] 由图1~2可以看出,在厌氧体系A和厌氧体系B条件下,当厌氧瓶培养基液面高度为1cm时,Akk菌基本不生长,只有当液面高度不低于2cm时,Akk菌才可在厌氧瓶中培养,且菌的生长速率和菌浓度与液面高度呈一定的正相关;平板培养时仅可以在培养基内部生长,但无法在培养基表面生长。而在本发明的培养体系下,Akk菌生长不受液面高低限制,既可以在厌氧瓶中良好生长繁殖,也可以在平板表面生长,大大提高了菌的培养成活率,降低了菌的培养难度,适用于菌种的筛选分离培养。

[0046] 实施例4 CO₂浓度对Akk菌生长的影响

[0047] 取Akk菌单菌落过夜活化,按1%的接种量接种到1mL改良BHI培养基,分别置于下述不同CO₂浓度的厌氧体系1~5下进行培养,37℃恒温培养30h,定时取样6000r/min离心5min,弃上清,用灭菌的PBS洗涤沉淀菌体2次,最后用PBS重悬菌体,通过分光光度计在600nm波长下测定菌浓度OD_{600nm},具体结果见表2。

[0048] 表2不同CO₂浓度对Akk菌生长的影响

[0049]

培养体系	1	2	3	4	5
------	---	---	---	---	---

[0050]

CO ₂ 浓度	1%	2%	5%	7%	10%
培养时间	菌浓度 OD _{600nm}				
12h	0.297	0.294	0.375	0.663	0.651
18h	0.516	0.534	0.831	1.068	0.933
24h	0.978	1.299	1.509	1.611	1.884
30h	1.65	1.887	1.947	1.872	1.599

[0051] 由表2可知,随着CO₂浓度的升高,Akk菌生长速率显著增加,菌液浊度也相应提高,但当CO₂浓度从5%增加到10%时,前期菌的生长速率较快,但到24h后,菌的生长速率放缓,30h的菌浓度反而相比5%CO₂有所降低,因此,5%CO₂为最适宜的培养条件。

[0052] 实施例5 NaHCO₃浓度对Akk菌生长的影响

[0053] 取Akk菌单菌落过夜活化,按1%的接种量分别接种到3mL含有0.7mM、1.4mM、3.5mM、7mM NaHCO₃的改良BHI培养基,置于95%N₂、5%H₂的厌氧体系下,37℃恒温培养30h,定时取样6000r/min离心5min,弃上清,用灭菌的PBS洗涤沉淀菌体2次,最后用PBS重悬菌

体,通过分光光度计在600nm波长下测定菌浓度OD_{600nm},具体结果见表3。

[0054] 表3不同NaHCO₃浓度对Akk菌生长的影响

[0055]

培养体系	1	2	3	4	5	6	7(open)
NaHCO ₃	0.7mM	1.4mM	3.5mM	7mM	-	-	-
CO ₂	-	-	-	-	5%	-	-
培养时间	菌浓度 OD _{600nm}						
12h	0.297	0.294	0.306	0.561	0.561	0.109	0.089
18h	0.528	0.534	0.831	0.918	0.933	0.079	0.072
24h	0.978	0.999	1.209	1.167	1.344	0.106	0.087
30h	1.497	1.71	1.938	1.767	1.983	0.145	0.103

[0056] 1-7为3mL培养体系,液面约3mL。

[0057] 由表3可知,在改良BHI培养基添加0.7mM~7mM的NaHCO₃时,相比于不添加组(培养体系6),Akk菌生长速率显著增加,说明NaHCO₃促进了菌株的生长繁殖,且随着NaHCO₃的升高,菌液浊度也相应提高,但当NaHCO₃浓度从3.5mM增加到7mM时,菌的生长速率差异不大,在30h时菌浓度反而有所降低,因此,3.5mM的NaHCO₃为最适宜的培养条件。

[0058] 实施例6效果验证

[0059] 1) 菌纯度

[0060] 取Akk菌单菌落过夜活化,按1%的接种量接种到1mL改良BHI培养基,在90%N₂、5%H₂、5%CO₂的厌氧条件下,37℃恒温培养24h,然后划线接种于改良BHI固体培养基,倒置培养2~3d,观察菌落形态(图3),同时取样,对菌体进行结晶紫染色,镜检观察菌的形态(图4),最后,分别取菌液和单菌落,在100℃煮10min,取1μL上清作为PCR模板,使用嗜黏蛋白阿克曼氏菌引物(引物序列:forward primer:CAGCACGTGAAGGTGGGGAC;reverse primer:CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT)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(图5)。

[0061] 由图3~5可知,平板中的菌落细小,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,镜检下Akk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,证明菌摇瓶培养液中的菌为纯菌。菌液和单菌落分别作为模板进行PCR扩增后,通过凝胶电泳检测,在250~500bp中间处有一条明显的条带,与327bp的目标基因大小一致,符合过往的报道。综上,能够得出菌液中的菌为纯的嗜黏蛋白阿克曼氏菌。

[0062] 2) 菌的生长曲线

[0063] 取OD₆₀₀为0.6的菌液按2%的接种量接种到200mL改良BHI培养基,在90%N₂、5%H₂、

5%CO₂的厌氧条件下,37℃恒温培养,定时取样测定菌浓度OD_{600nm},生长曲线如图6所示,每组3个平行。

[0064] 本发明的培养基和培养条件的配合使得Akk菌的生长繁殖不受液面高低限制,既可以在摇瓶中良好生长,也可以在平板表面良好生长,降低了Akk菌的培养难度,同时使得Akk菌的生长速度由现有技术的3~4d降为24~36h,极大的缩短了培养时间,提高了Akk菌的活性并促进了Akk菌的生长,对Akk菌的扩大化培养和深入研究具有重要意义。

[0065] 由图6可知,Akk生长速率较快,没有明显的延滞期,即进入对数生长期的时间短,菌的活性高,且由对数期进入稳定期的时间为8~28h,培养32h时,菌浓度达到最大,OD_{600nm}为2.109,经活菌计数,得到最大活菌浓度为 2.4×10^{12} cfu/mL,极大地缩短了培养时间,促进了Akk菌的生长,且相比现有技术能够得到更多的活菌数,表明本发明提供的培养条件完全能够实现Akk的体外扩大培养。

序列表

<110> 君维安(武汉)生命科技有限公司

<120> 一种嗜黏蛋白阿克曼氏菌的厌氧培养方法

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

cagcacgtga aggtggggac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

ccttgcggtt ggcttcagat 20

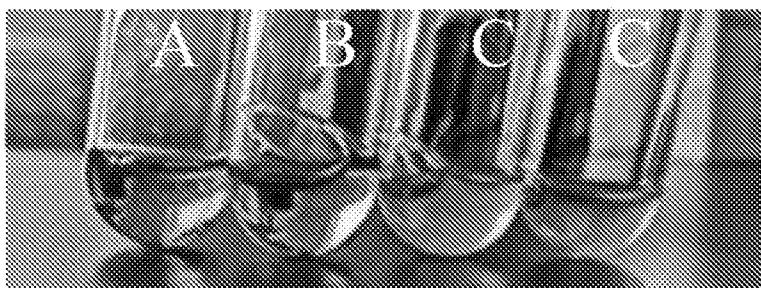


图1

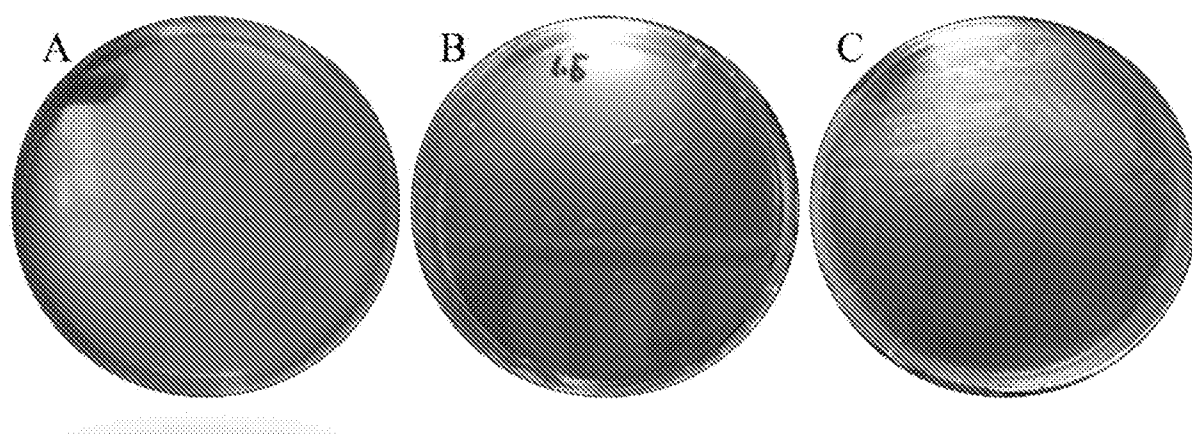


图2

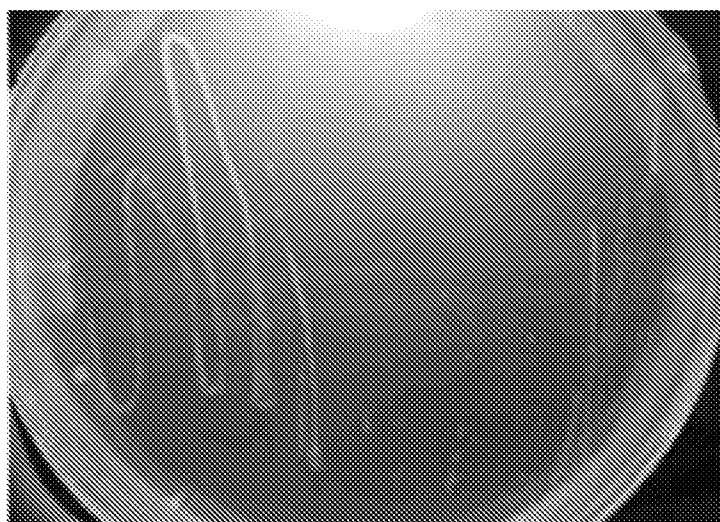


图3

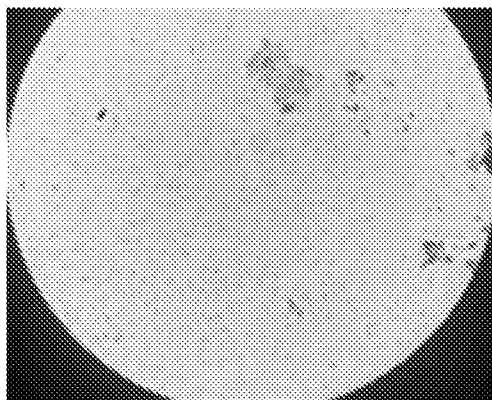


图4

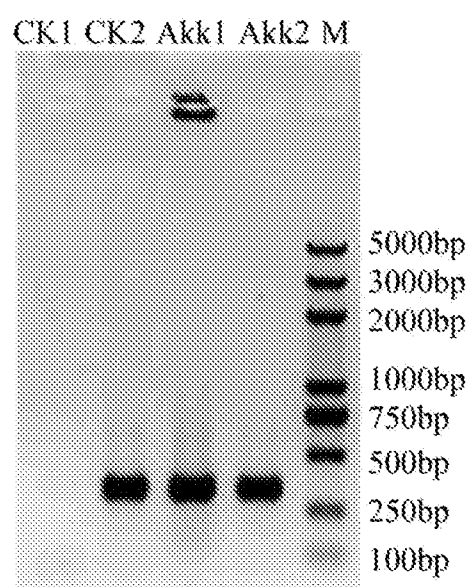


图5

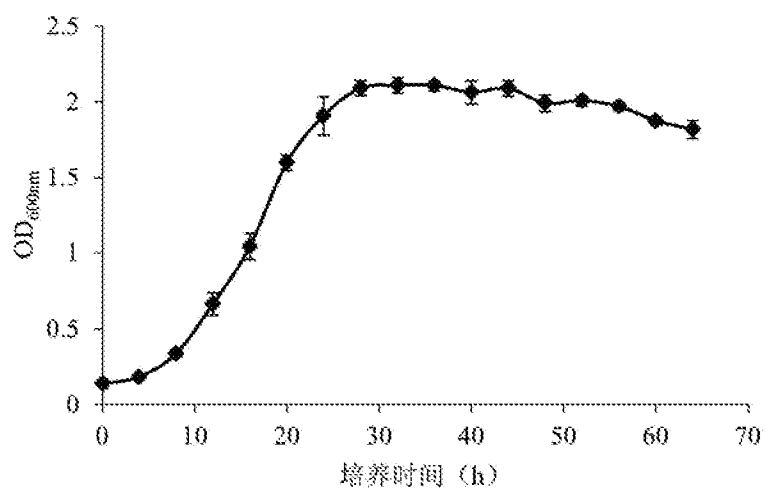


图6