



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113322202 A

(43) 申请公布日 2021. 08. 31

(21) 申请号 202110597661.7

(22) 申请日 2021.05.31

(83) 生物保藏信息

CCTCC M 2021388 2021.04.16

(71) 申请人 君维安(武汉)生命科技有限公司

地址 430073 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

(72) 发明人 刘智 聂庆庆 舒婷 陈嘉敏
王敏

(74) 专利代理机构 武汉臻诚专利代理事务所
(普通合伙) 42233

代理人 胡星驰

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/32 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

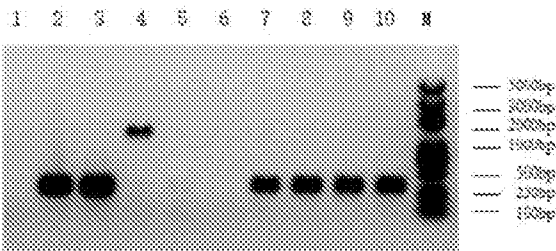
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

一种阿克曼氏菌、其培养方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种阿克曼氏菌,其分类命名为Akkermansia muciniphilaJWA48,于2021年4月16日保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2021388。本发明通过菌株筛选获得了一株阿克曼氏菌,其具有生长快、产量高、且对培养条件要求相对较低的优势。与市售的阿克曼氏菌相比,最大生物量提高约50%,且能耐受0.5%以下的O₂浓度。



M: DL2000; 1: 阴性; 2: 阳性; 3: AKK标准株;
4: 2005; 5: 2002; 6: 2002; 7: 2001-4; 8: 2001-3;
9: 2001-2; 10: 2001-1

1. 一种阿克曼氏菌,其特征在於,其分类命名为 *Akkermansia muciniphila* JWA48,于2021年4月16日保藏于中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2021388。

2. 如权利要求1所述的阿克曼氏菌的培养方法,其特征在於,控制所述阿克曼氏菌的培养气氛中氧气浓度在0.5%以下。

3. 如权利要求1所述的阿克曼氏菌的应用,其特征在於,应用于制备具有减肥降脂功效的食品、食品添加剂、或药品。

4. 如权利要求1所述的阿克曼氏菌的应用,其特征在於,应用于制备神经保护制剂。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在於,应用于制备具有抗焦虑、或抗抑郁作用的神经保护制剂。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在於,应用于制备具有抗酒精渴求和依赖导致的焦虑或酗酒作用的神经保护制剂。

7. 如权利要求1所述的阿克曼氏菌的应用,其特征在於,应用于制备抗抑郁症食品、食品添加剂、或药品。

一种阿克曼氏菌、其培养方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,更具体地,涉及一种阿克曼氏菌、其培养方法及其应用。

背景技术

[0002] *Akkermansia muciniphila* (*A.muciniphila*,嗜粘蛋白-阿克曼氏菌,本文简称为Akk菌)是在2004年由荷兰瓦赫宁根大学微生物学实验室的研究者们从人类粪便中鉴定出的一种新的粘液降解菌。它是一种椭圆形的革兰阴性菌,是人体肠道的常驻民,占人体微生物群落的3-5%。它能在肠道粘液层中生长,并利用宿主分泌的粘蛋白“为食”,从而通过竞争性排斥的方式在肠道内定居并保护肠道免受病原体的侵害。

[0003] 目前,Akk菌在肥胖、IBD、渐冻症、孤独症、癫痫、高血压等疾病中都被报道了负相关关系。在近几年的癌症免疫疗法研究中,也被发现参与了患者对PD-1阻滞剂的响应程度。

[0004] 然而Akk菌株是一种严格厌氧的肠道菌株,对培养条件要求苛刻,2004 年首次分离到Akk菌株,通常需要猪胃黏蛋白作为唯一碳源及氮源的培养基中方良好的生长,陆续的也有一些关于Akk培养基或培养条件优化的报道,中国专利CN201910721005.6,CN201910865365.3,CN202010687713.5 也通过优化培养条件及配方来促进Akk菌株筛选分离及工业化应用。

发明内容

[0005] 针对现有技术的以上缺陷或改进需求,本发明提供了一种阿克曼氏菌、其培养方法及其应用,其目的在于通过菌株筛选得到一株阿克曼氏菌,其在普通培养条件下生长较快总生物量较大,并且具有相对良好的氧气耐受能力,同时发现了其诸多新应用,由此解决现有的AKK菌株培养条件苛刻、生长较为缓慢的技术问题。

[0006] 为实现上述目的,按照本发明的一个方面,提供了一种阿克曼氏菌,其分类命名为 *Akkermansia muciniphila* JWA48,于2021年4月16日保藏于中国武汉中国典型培养物保藏中心CCTCC,保藏编号为CCTCC M 2021388。

[0007] 按照本发明的另一个方面,提供了所述的阿克曼氏菌的培养方法,其控制所述阿克曼氏菌的培养气氛中氧气浓度在0.5%以下。

[0008] 按照本发明的另一个方面,提供了所述的阿克曼氏菌的应用,其应用于制备具有减肥降脂功效的食品、食品添加剂、或药品。

[0009] 按照本发明的另一个方面,提供了所述的阿克曼氏菌的应用,其应用于制备神经保护制剂。

[0010] 优选地,所述阿克曼氏菌的应用,其具体应用于制备具有抗焦虑、或抗抑郁作用的神经保护制剂。

[0011] 优选地,所述阿克曼氏菌的应用,其具体应用于制备具有抗酒精渴求和依赖导致的焦虑或酗酒作用的神经保护制剂。

[0012] 按照本发明的另一个方面,提供了所述的阿克曼氏菌的应用,其应用于制备抗抑郁症食品、食品添加剂、或药品。

[0013] 总体而言,通过本发明所构思的以上技术方案与现有技术相比,能够取得下列有益效果:

[0014] 本发明通过菌株筛选获得了一株阿克曼氏菌,其具有生长快、产量高、且对培养条件要求相对较低的优势。与市售的阿克曼氏菌相比,最大生物量提高约50%,且能耐受0.5%以下的 O_2 浓度。

[0015] 同时本发明发现该阿克曼氏菌在调节脂代谢、具有神经保护作用、以及抗抑郁症作用。

附图说明

[0016] 图1是实施例1分离得到的AKK菌株琼脂糖凝胶电泳图;

[0017] 图2是实施例1分离得到的AKK-JWA菌株固体培养基上形态;

[0018] 图3是实施例2Akk-JWA菌株及与市售菌株生长活力比较,其中图3(A) 是Akk-JWA菌株及与市售菌株生长曲线图,图3(B) 是Akk-JWA菌株及与市售菌株在不同氧气浓度条件下的生长活力比较;

[0019] 图4是实施例3口服Akk-JWA肥胖小鼠的体重变化图;

[0020] 图5是实施例3口服Akk-JWA肥胖小鼠的空腹血糖含量;

[0021] 图6是实施例3口服Akk-JWA肥胖小鼠的葡萄糖耐量;

[0022] 图7是实施例3口服Akk-JWA肥胖小鼠的肝脏(左)及性腺脂肪(右) HE染色结果图;

[0023] 图8是实施例4旷场实验小鼠活动总距离统计结果图;

[0024] 图9是实施例4旷场实验小鼠在中间区域活动时间统计结果图;

[0025] 图10是实施例4旷场实验小鼠活动线路图;

[0026] 图11是实施例4悬尾实验中小鼠静止时间统计结果图;

[0027] 图12是实施例5三室社交实验结果图,其中图12A是第一阶段偏好性记录结果图,结果显示两边无偏好性;图12B是第二阶段小鼠交流时间结果记录图,结果显示实验小鼠与陌生小鼠的社交显著增加;图12C是第三阶段与新放入小鼠交流时间结果记录,结果显示实验小鼠与新放入小鼠社交增加;

[0028] 图13是实施例5埋石实验结果图。

具体实施方式

[0029] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0030] 不同于以往优化培养条件来提高阿克曼氏菌的生物量的技术方案,本发明通过筛选对培养条件要求宽松的菌株或是在生长上有优势的菌株来提高工业化生产阿克曼氏菌生物量,是Akk菌株转向工业化的一条重要途径。筛选出一株耐受低浓度氧能力更强,利于工业化应用,同样培养条件下生物量提高50%的阿克曼氏菌。同时该菌株具有良好的氧气

耐受能力,在氧气浓度0.5%以下的环境气氛下,仍然保持良好生长活力。

[0031] 另外本发明同时发现所述阿克曼氏菌在缓解精神疾病如酒精渴求和依赖导致的焦虑、酗酒等神经保护方面的应用。

[0032] 焦虑症、酗酒等神经损伤患者脑内先天免疫信号分子的水平增加,并导致神经炎症,已有研究表明,微生物群在这一过程中起着关键作用,并影响中枢神经化学和行为。微生物群和大脑之间的密切相互作用的中断或改变可能是许多神经性疾病的一个重要因素。

[0033] 众所周知,压力、焦虑和抑郁与胃分泌物有关,并可能影响微生物群。另一方面,调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的微生物群组成的改变可能与精神疾病如酒精渴求和依赖的发展有关。因此,肠-脑轴的调节越来越被认为是开发新疗法的合适目标。

[0034] 以下为实施例:

[0035] 实施例1阿克曼氏菌的筛选分离

[0036] 我们通过采集受试人员的健康新鲜粪便样本,通过梯度稀释获得各梯度稀释液,分别接种至粘蛋白液体培养基进行粪便样本中Akk的初筛及富集,以上述菌液为模板,使用针对Akkermansia属的引物进行PCR,挑选PCR 反应阳性管中稀释度最大的菌液重复上面富集步骤,经过几轮富集后,选取稀释度最大的富集液进行平板涂布分离,对平板上的单菌落进行逐个鉴定,获得Akk菌株。

[0037] 具体过程:挑选PCR反应阳性管中的菌液,在Mucin基础盐固体平皿上进行划线(3块板),得到的单菌落刮取菌落进行PCR验证,选取最大稀释倍数下的阳性样本,将对应的平行板中菌落用接种环全部刮下,涂平板使平板内长出40-100个菌落(5块平皿),按区域或菌落大小形态挑取全部单菌落接入96孔板中培养(BHI+Mucin培养基),以两排为单位合并提DNA 进行PCR验证,选取缩小范围后的阳性样本,进行单个菌液验证,最终筛选获得Akk菌株。

[0038] 黏蛋白培养基配方:基础培养基+0.25%粘蛋白

[0039] 基础培养基成分如下表所示:

	化合物	含量 (/1L)
	KH_2PO_4	0.4g
	Na_2HPO_4	0.53g
	NH_4Cl	0.3g
	NaCl	0.3g
[0040]	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1g
	CaCl_2	0.11g
	微量元素	1ml
	维生素溶液	1ml
	0.1%刃天青	1ml
	NaHCO_3	4g

[0041] 步骤:

[0042] 1. 分离筛选

[0043] a. 配置菌液: 粪便与生理盐水混匀后稀释得稀释液, 稀释液中粪便浓度为10-6g/ml, 所述稀释液接种于粘蛋白液体培养基中, 稀释液和粘蛋白液体培养基的体积比为1:9, 培养后得菌液; 37℃厌氧培养5d。

[0044] b. PCR扩增: 以上述菌液为模板, 使用针对Akkermansia属的引物进行PCR。

[0045] c. 挑选PCR反应阳性管中的菌液, 将稀释度最大的阳性样本的菌液梯度稀释后, 再次接种于粘蛋白液体培养基中, 菌液和粘蛋白液体培养基的体积比为1:9, 继续富集培养后得菌液, 37℃厌氧培养5d。循环此步骤, 直到分离纯化出Akk。

[0046] 阿克曼氏菌鉴定:

[0047] Akkermansia属的特异性引物:

[0048] F: 5' CAGCACGTGAAGGTGGGGAC 3'

[0049] R: 5' CCTTGCGTTGGCTTCAGAT 3'

[0050] PCR扩增步骤:

[0051] 菌液经PBS稀释 (pH7.4) - 基因组提取 - 核酸电泳鉴定DNA提取结果以上述基因组为模板, 以F: 5' CAGCACGTGAAGGTGGGGAC 3'

[0052] R: 5' CCTTGCGTTGGCTTCAGAT 3' 为引物, 进行PCR扩增

[0053] 扩增体系如下 (20uL):

[0054]

模板	1uL
引物F	1uL
引物R	1uL
Mix	7uL

DDH2O	10uL
-------	------

[0055] 阳性对照以Akk DNA为模板,阴性对照以H₂O为模板。

[0056] PCR程序如下:

1	95℃	10min
2	95℃	30s
3	55℃	30s
4	72℃	1min
5	Goto step2	30×
6	72℃	10min
7	4℃	∞

[0058] 将上述PCR产物收集,跑核酸电泳。以DL5000 DNA ladder为Marker,确定目标条带,选取阳性样本进行后续操作。

[0059] 挑选PCR反应阳性管中的菌液,在Mucin基础盐固体平皿上进行流线(3块板),得到的单菌落刮取菌落进行PCR验证,选取最大稀释倍数下的阳性样本,将对应的平行板中菌落用接种环全部刮下,涂平板使平板内长出40-100个菌落(5块平皿),按区域或菌落大小形态挑取全部单菌落接入96孔板中培养(BHI+Mucin培养基),以两排为单位合并提DNA进行PCR验证,选取缩小范围后的阳性样本,进行单个菌液验证,最终筛选获得Akk菌株。

[0060] 经PCR验证(附图1)证明梯度稀释的粪便样本中成功富集到Akk菌株,筛选得到一株新的Akk菌株,命名为Akkermansia muciniphila JWA48(简称为Akk-JWA),保藏号为:CCTCC M 2021388,该菌株平板形态如附图2所示。使用16sRNA分析菌株序列为:SEQ NO.1。经NCBI比对,确定为全新的Akkermansia muciniphila(嗜粘蛋白-阿克曼氏菌)。

[0061] 实施例2培养实验

[0062] 将冻存的Akk菌种和Akk-JWA菌种活化后接种BHI+M液体培养基作为种子液,37℃厌氧培养64小时,测定OD值,调整种子液浓度一致后分别接种发酵液,以2%接种量转接发酵液(100ml),每间隔一定时间吸取200ul发酵液测定菌浓(OD600)。

[0063] 制作生长曲线如图3(A)所示,从生长曲线可以看出,Akk-JWA菌株生长上具有一定的优势,达到稳定期时生物量增加到对照菌量的145%,OD值从0.59增加至0.78,对应的最大生物量从 6.7×10^7 CFU/ml增加至 9.7×10^7 CFU/ml,即每毫升发酵液中菌体回收量增加了 3×10^7 CFU/ml,生物量提高约50%,极大的利于工业化应用。

[0064] 培养基不变,调整培养条件中气体组分(在厌氧试管中注射不同含量的氧气),可以看出(图3(B)),在无氧有CO₂常规条件下,Akk-JWA与Akk菌株均能生长,但在低氧条件下,0.1%及0.5%O₂浓度下,Akk-JWA菌株依然能保持存活,Akk则不能生长,说明Akk-JWA菌株对氧气有良好的耐受能力,这对工业上条件的控制来说至关重要,因为生产上严格厌氧的条件极难维持,偶然的O₂渗漏在所难免,而对氧气更加耐受的菌株在生产上会更有应用价值。

[0065] 实施例3实施例1提供的阿克曼氏菌在减肥降脂上的应用

[0066] 取8周龄C57BL/6雄性小鼠,实验小鼠饲养条件为无特定病原体(SPF)级别,各笼小鼠适应性喂养1周后进行后续实验,小鼠被安置在恒温25±2℃,相对湿度为50±5%,昼夜循环12/12h。20只小鼠每组6只,每笼3只,其中健康对照组维持饲料(ND)喂养,其他小鼠

高脂饲料(HFD(Research Diets D12492))喂养,7周后剔除体重不达标小鼠,驯化的小鼠根据体重被分配到不同的组,以确保相同的起点,分别灌胃PBS(肥胖对照组)和Akk菌悬液(PBS重悬,每三天灌胃一次),益生菌组的剂量为 1×10^9 CFU/ml,喂养期间随意饮食,ND组和HFD组灌胃量200 μ l,每天同样时间灌胃,每周测定小鼠体重及进食量,灌喂15天后检测小鼠肥胖相关指标评价Akk对小鼠减肥降脂效果。

[0067] 灌胃Akk-JWA的肥胖小鼠体重在15天里显著降低(附图4),空腹血糖值更低,与正常值相近(附图5),葡萄糖耐量更强(附图6),证明了服用Akk-JWA能改善小鼠的胰岛素抵抗,有治疗糖尿病潜力。

[0068] HE染色结果(附图7)显示服用Akk-JWA能显著改善小鼠肝脏脂肪沉积,减小性腺脂肪细胞大小,改善性腺脂肪细胞排列整齐度,中椭圆形内空泡为肝脏脂肪沉积,空泡越多越大,脂肪沉积越严重,服用Akk-JWA的小鼠肝脏空泡减少且尺寸变小,脂肪细胞大小均匀,排列整齐,尺寸变小,均是小鼠更加健康、低脂的标志。

[0069] 实施例4实施例1提供的阿克曼氏菌在改善神经性疾病方面的应用

[0070] 取8周龄C57BL/6雄性小鼠,实验小鼠饲养条件为无特定病原体(SPF)级别,小鼠被安置在恒温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度为 $50 \pm 5\%$,昼夜循环12/12h。

[0071] 具体实验步骤:24只小鼠分成4组,对照组1:正常液体饲料组+PBS;对照组2:正常液体饲料组+Akk;实验组1:液体饲料组(含4%酒精)+PBS;实验组2:液体饲料组(4%酒精)+Akk;每组6只。各笼小鼠适应性喂养1周后进行后续实验,实验组采用4%酒精度的液体饲料喂养31天,对照组采用正常液体饲料喂养,期间每两天灌喂一次200 μ l PBS(对照组1,实验组1)/ 1×10^9 CFU/200 μ l Akk(对照组2,实验组2),在第28,29天所有组小鼠灌喂20mg/kg LPS,在第31天进行旷场试验、悬尾实验进行行为学评价,考察Akk对小鼠神经损伤的改善效果。

[0072] 旷场试验是评估啮齿动物焦虑行为最常用的行为学测试方法之一。啮齿动物进入旷场箱后因其对新环境的恐惧心理,所以倾向于避开旷场的中心区域,停留在箱壁周边的区域活动。但是,啮齿动物的探索特性又使其产生在中央区域探索的冲动,因而形成矛盾冲突。具有缓解焦虑作用的物质可解除这种冲突状态,表现为在不改变总活动量的情况下,增加啮齿动物进入旷场中央区域的次数及在中央区域逗留的时间。所以使用中央区域活动的变化作为啮齿动物焦虑状态评价的指标。值得注意的是,抗焦虑治疗本身不会增加对于旷场的探索,但是它们减轻了焦虑对探索行为的抑制作用。

[0073] 旷场是由旷场箱和视频采集系统两部分组成,其中旷场箱高40cm,底边为40cm $\times$ 40cm。于末次灌胃30min后进行实验,实验在安静的环境下进行。实验前将小鼠放入铺有垫料的盒子里,任其自由探索5min。实验开始时,将小鼠迅速放入旷场中央,同时开始视频采集和计时,记录小鼠10 min内的活动情况。采集结束后清理擦拭旷场,清除粪便和尿液,消除小鼠遗留的气味后再进行下一只小鼠的测试,避免气味和残留物对下一只小鼠的影响。以10min内运动总距离、进入中央区域次数和停留时间为指标,使用软件EthoVision XT 11进行数据分析。

[0074] 悬尾实验(Tail suspension test,TST)是一种经典而又能快速评价抗抑郁药物、兴奋药物、镇静药物药效的方法。其原理是利用小鼠悬尾后企图逃脱但又无法逃脱,从而放弃挣扎,进入特有的抑郁不动状态,实验过程中记录动物不动时间来反映抑郁状态,抗抑郁

药物、兴奋药物能明显地缩短改变其状态。

[0075] 将小鼠尾部后1/3处用胶带固定,悬挂于支架上,头部距离台面15cm,进行摄像,摄像背景与小鼠毛色呈明显反差,白色小鼠采用黑色背景。计时6min后停止,利用小动物行为学分析软件:用Smart 2.5软件对小鼠后四分钟(3-6min)的不动时间进行统计。

[0076] 通过小鼠旷场实验及悬尾实验,从行为学上考察Akk-JWA菌株对小鼠的神经保护作用。

[0077] 从附图8,9,10,11可以看出,小鼠旷场实验中,口服Akk-JWA的小鼠相比处理组活动总距离更远,中间区域活动时间更长,与未处理的正常组行为更相近;同时在悬尾实验中,口服Akk-JWA的小鼠相比处理组不动时间更短,存在显著差异,与未处理的正常组行为更相近,综合结果表明 Akk-JWA菌株能缓解小鼠精神疾病如酒精渴求和依赖导致的焦虑、酗酒,具有显著的神经保护作用。

[0078] 实施例5阿克曼氏菌在改善自闭症方面的应用

[0079] 无特定病原体清洁级 (SPF) 断奶3-4周龄C57BL/6J雄鼠30只,小鼠被安置在恒温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $50 \pm 5\%$,昼夜循环12/12h。一名4周岁ASD儿童粪便临床样本一份。

[0080] 适应性喂养1天后,对小鼠进行抗生素处理:一种广谱抗生素混合物包括万古霉素(0.1g/L)、新霉素(0.2g/L)、氨苄西林(0.2g/L)和甲硝唑(0.2g/L),混合在饮用水中饲喂14天。

[0081] 清肠处理:聚乙二醇生理盐水溶液为水源进行饮用,小鼠连续饮用3天。

[0082] 粪便移植:小鼠清肠后,随机分为两组:正常组,ASD模型组(20只)。正常组灌胃生理盐水,ASD模型组用自闭症(ASD)儿童粪便上清灌胃,取粪便样本上清液单次灌胃100uL/只小鼠,间隔一天,连续灌14天。

[0083] 粪便菌群移植14天后,将ASD组分为两组,一组灌胃生理盐水,一组灌胃Akk-JWA,正常组依然灌胃生理盐水。间隔一天灌胃,连续14天后进行行为学检测。

[0084] 行为学主要包括三室社交:第一阶段:熟悉阶段,将实验小鼠放在中间格子,两边格子各放一个空笼,打开隔板,小鼠自行探索,使用Smart3.0记录小鼠对两边格子是否有偏好性,十分钟后结束,取出小鼠休息10min。第二阶段:其中一个笼子随机放进一只与实验小鼠完全陌生的小鼠strange1,另一个笼子放入木块玩具。放入实验小鼠,使用Smart3.0记录10分钟内实验小鼠与strange1交流的时间。第三阶段:保持strange1不动,另一边撤走木块,放入新的小鼠strange2,观察记录10分钟。结果如图12A、B、C所示。

[0085] 埋石实验(MB):在正常笼底,填充3-4厘米的新鲜木屑垫层,首先将小鼠在实验笼中习惯10分钟,然后将其转移到一个新的干净笼中,将实验笼中垫料重新平铺,在上面放置20个玻璃珠(4×5),将小鼠放到实验笼子中,10分钟后,老鼠被放回自己的笼子,并被移走,记录并拍摄被埋玻璃珠的数量(玻璃珠2/3以上的体积被盖住则记为被掩埋)。结果如图13所示。

[0086] 通过小鼠三室社交实验及埋石实验,从行为学上考察Akk-JWA菌株对自闭症小鼠的改善作用。

[0087] 从附图12,13可以看出,小鼠移至自闭症患者粪便后,出现明显的自闭症症状,体现在与其他老鼠及新老鼠交互时间明显减少即社交减少,埋石行为增加。通过灌胃Akk-JWA菌株后,社交行为明显增加,体现在相比玩具与其他老鼠的社交行为更多,与新老鼠的社交

明显增加,重复行为显著降低,即自闭症相应症状显著改善,表明Akk-JWA菌株具有显著的改善自闭症的效果。

[0088] 本领域的技术人员容易理解,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 君维安(武汉)生命科技有限公司

<120> 一种阿克曼氏菌、其培养方法及其应用

<130> 无

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 4

<211> 1411

<212> DNA

<213> *Akkermansia muciniphila*

<400> 4

```

caacggtctc ccttaggacc ctgcctcett gcggttgget tcagatactt cgggtgcgac 60
cggttccat gatgtgacgg gcggtgtgta caagaccgg gaacgtatc acggcgccgt 120
agctgatgcg ccattactag cgattccggc ttcgtgtagg cgggttgacg cctacagtcc 180
gaactgggcc cagtttttag gatttcctcc gcctcgcggc ttcggccccc tctgtactgg 240
gcattgtagt acgtgtgcag ccctgggcat aagggccata ctgacctgac gtcgtcccca 300
ccttcctccc agttgatctg ggcagtctcg ccagagtcce caccttcacg tgctggtaac 360
tggcaacagg ggttgcgctc gttgctggac ttaaccaaac atctcacgac acgagctgac 420
gacggccatg cagcacctgt gtaacgcctc cgaagagtcg catgctttca catgttggtc 480
attacatgtc aagcccaggt aaggttcttc gcgttgcatc gaattaagcc acatactcca 540
ccgcttggtc ggggtccccgt caatttcttt gagttttaat cttgcgaccg tactccccag 600
gcggcacgct taacgcgta gctccggcac gcagggggtc gattccccgc acaccaagcg 660
tgcaccgttt actgccagga ctacaggggt atctaatecc tttcgctccc ctggccttcg 720
tgccctcagc tcagttaatg tccaggaacc cgccttcgcc acgagtgttc ctctcgatat 780
ctacgcattt cactgctaca ccgagaattc cggttccccc tccattactc tagtctcgca 840
gtatcatgtg ccgtccgcgg gttgagcccc cgcctttcac acacgactta cgaaacagcc 900
tacgcacgct ttacgcccag tgattccgaa caacgcttga gacctctgta ttaccgcggc 960
tgctggcaca gagttagccg tctcttcctc ttgtggtaact atctttttaa tttgctccca 1020
catgacaggg gtttacaate cgaagacctt cattccccca cgcggcgctc caccatcagg 1080
gtttccccca ttgtgaatga ttctcgactg ctgccaccg taggtgtctg gaccgtgtct 1140
cagttccagt gtggccggac atcctctcag accggtacc cgtcatcgcc ttggtgagcc 1200
gttacctcac caactaacta atagcccgcg agccatecc caagcgcat gctgcttta 1260
tctttcgata ctatgcggt ttaatcccag tttcccagg ctatcccgt ctcgggggca 1320
ggttactcac gtgttactca cccgtgcgcc actagagaat tattagcaag ctagcaattc 1380
tctcgttcga cttgcattct tcacgccgcc g 1411

```

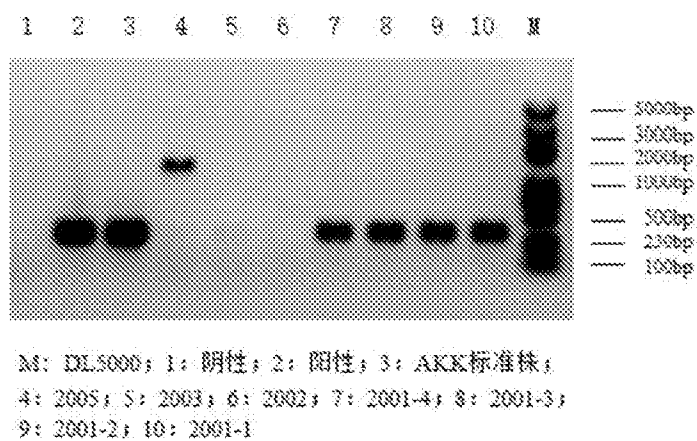


图1

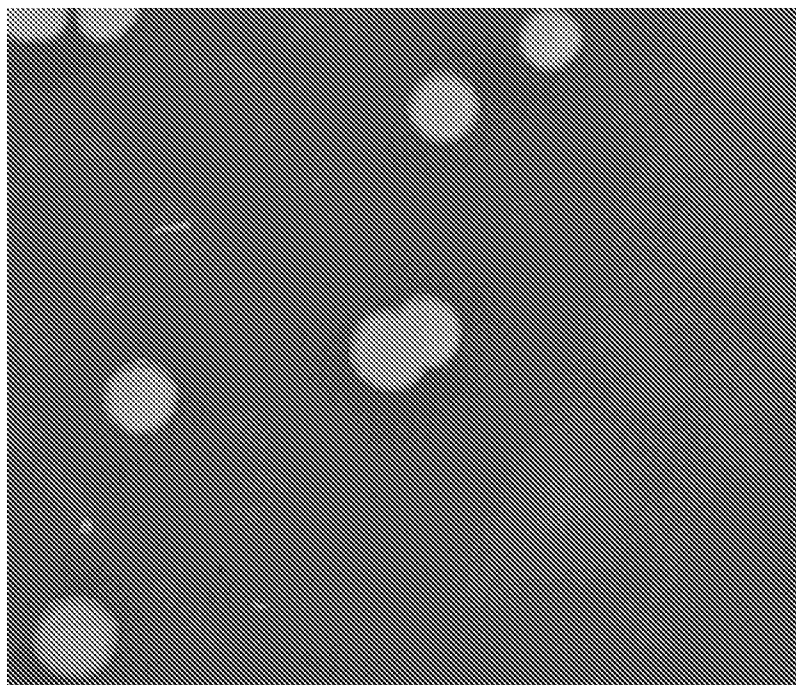
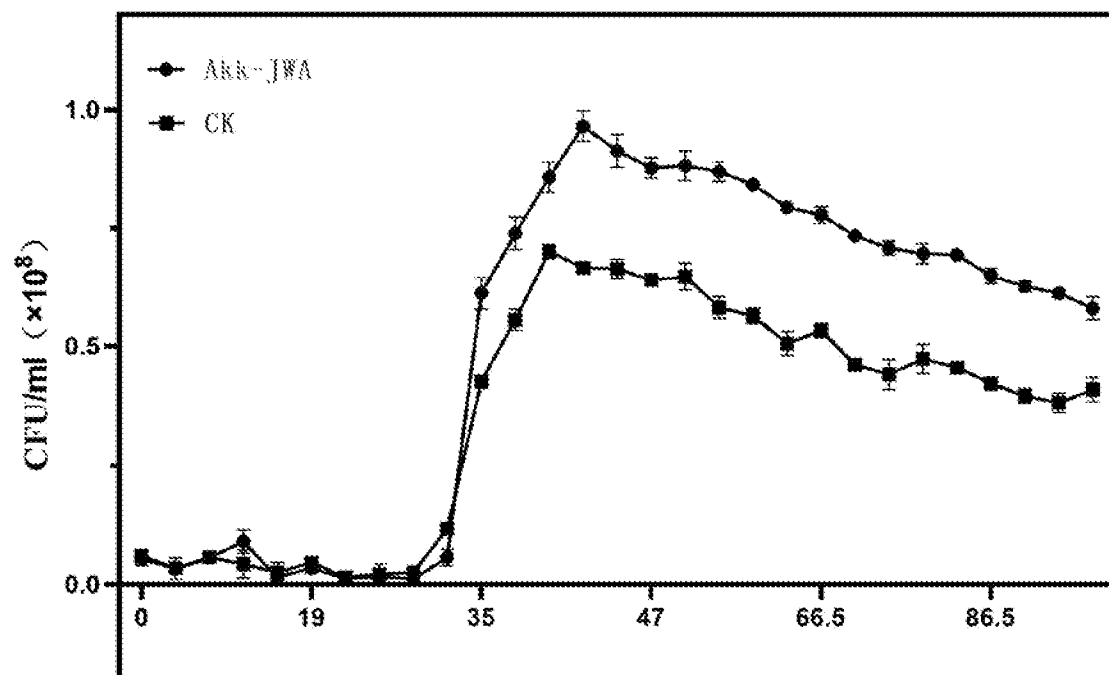


图2



生长曲线

图3 (A)

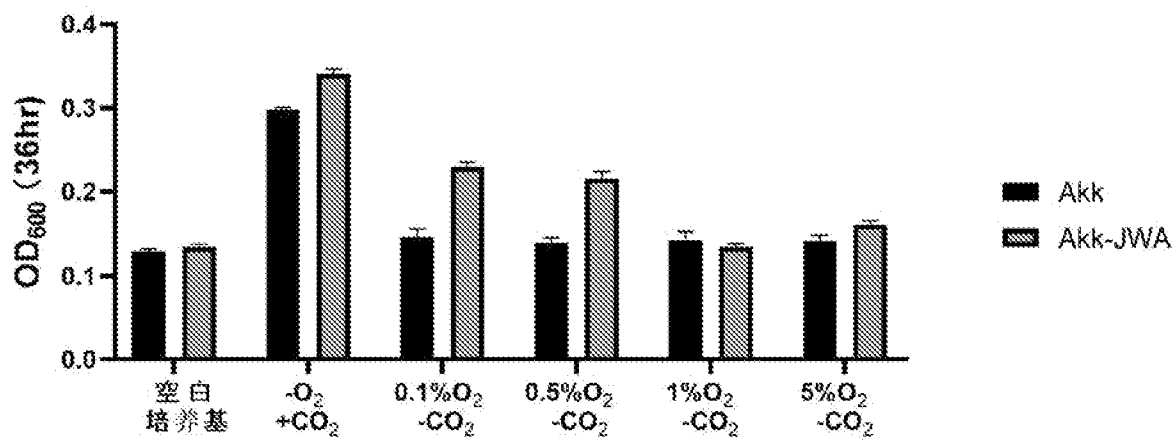


图3 (B)

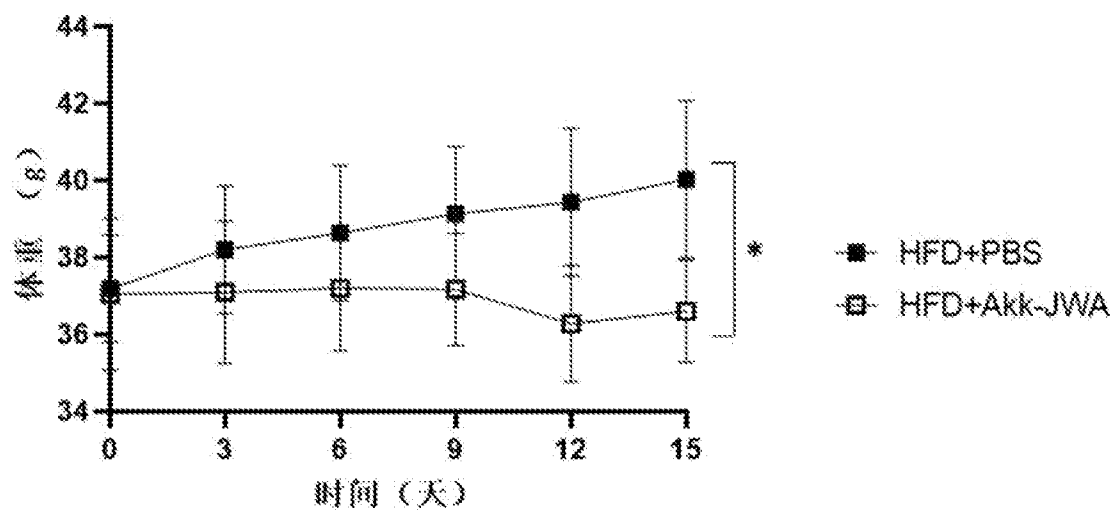


图4

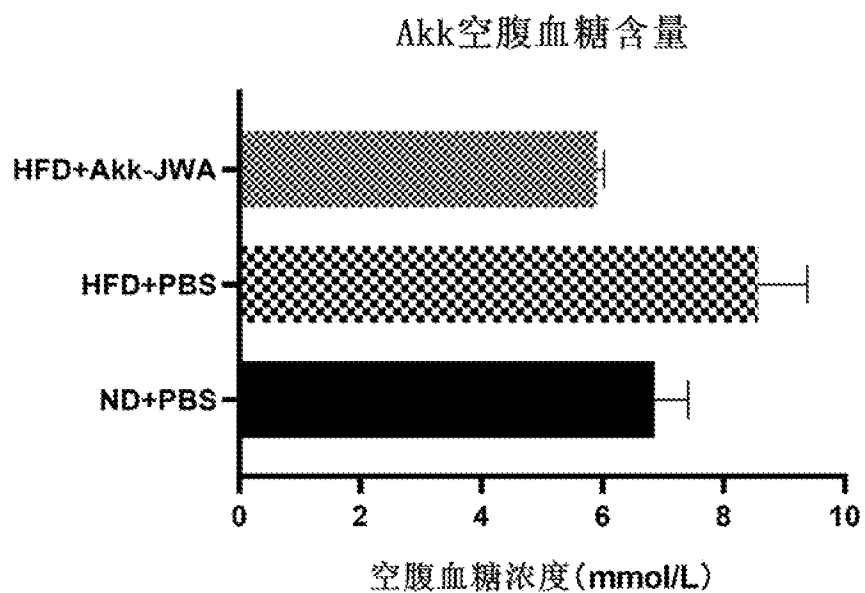


图5

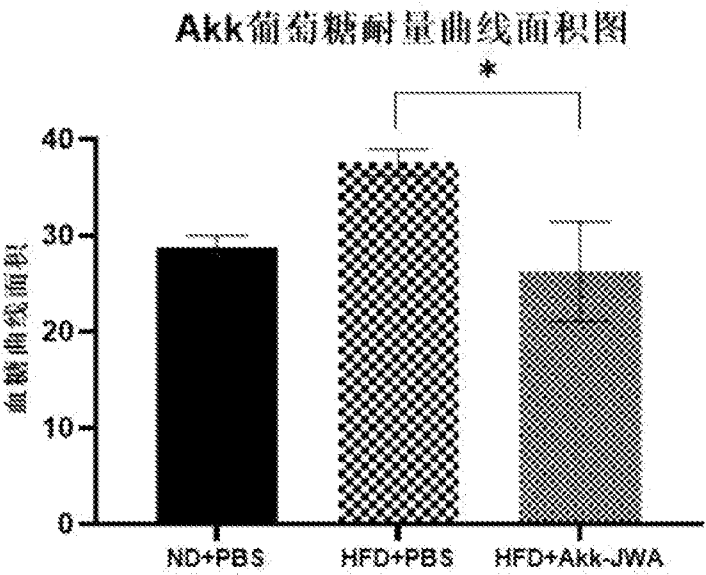


图6

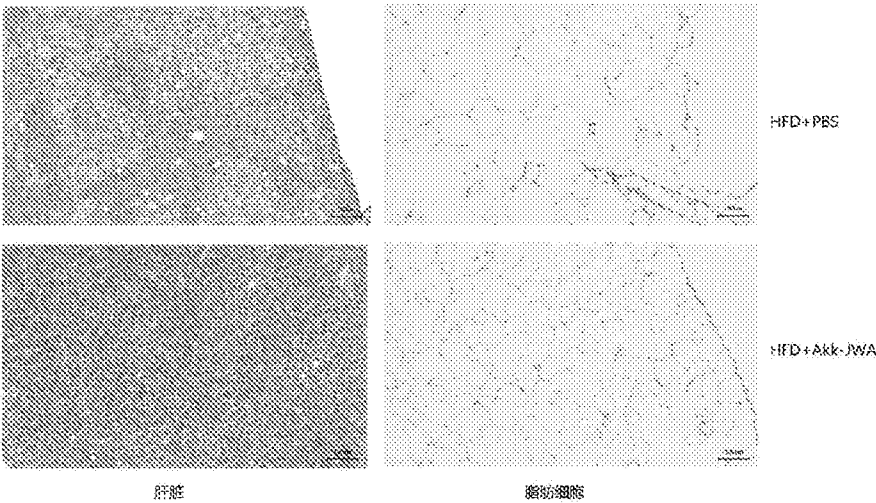


图7

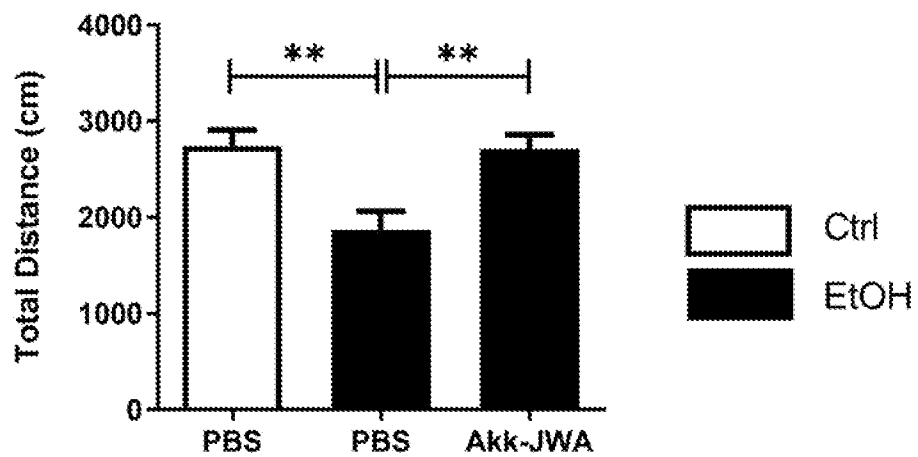


图8

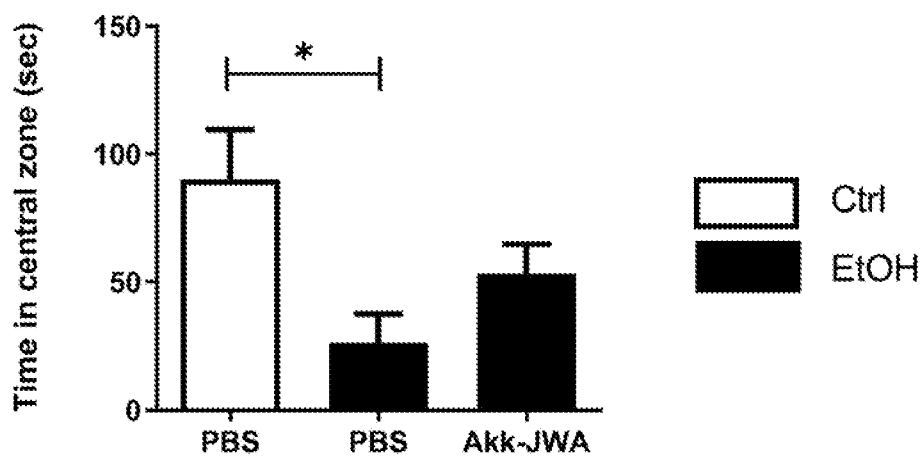


图9

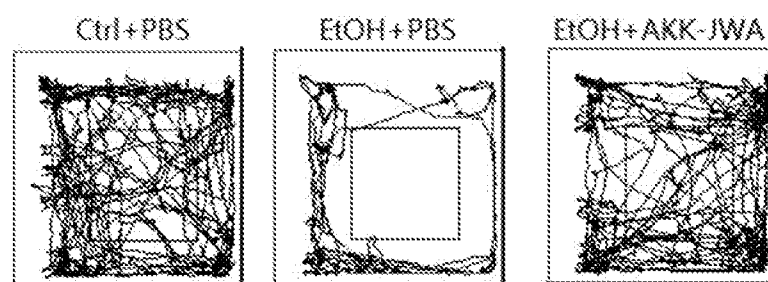


图10

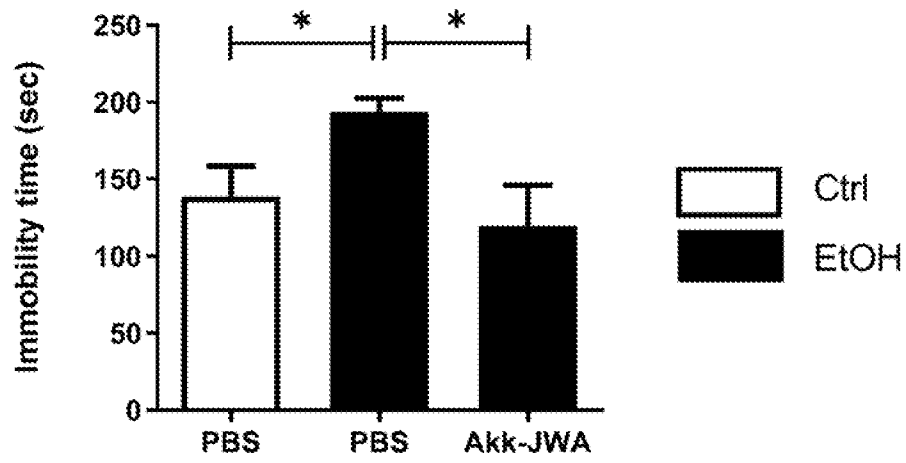


图11

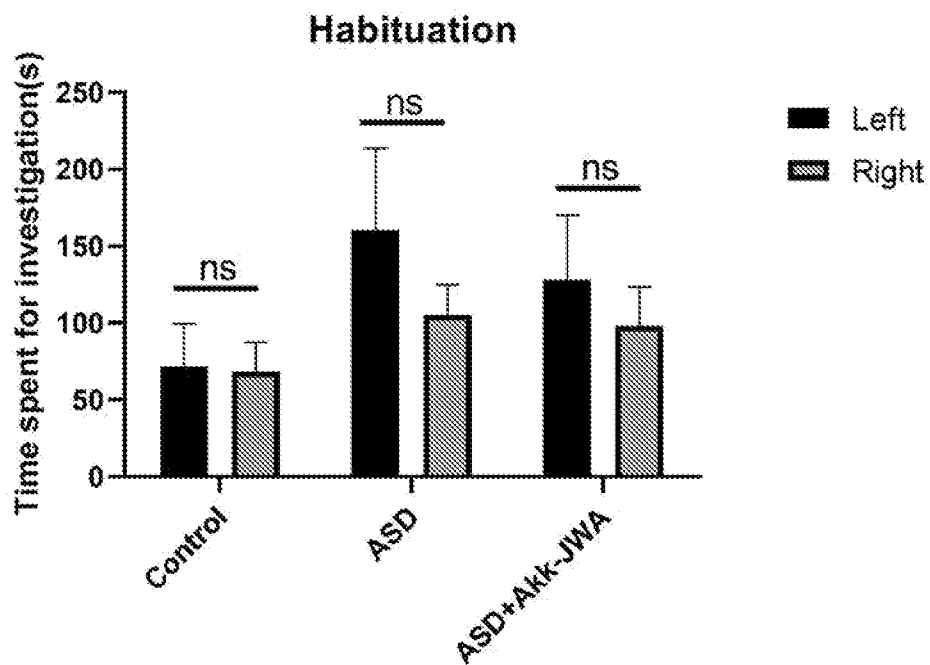


图12A

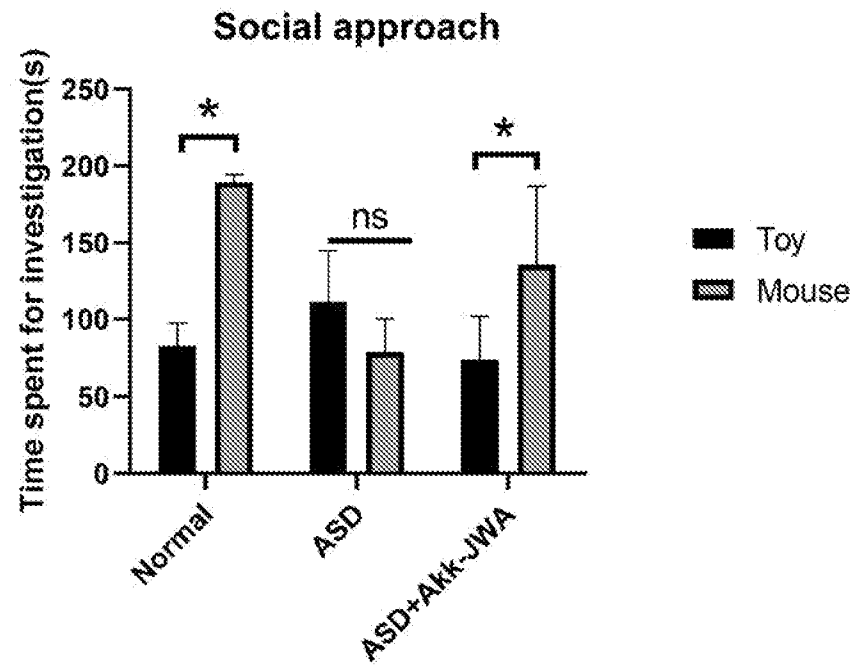


图12B

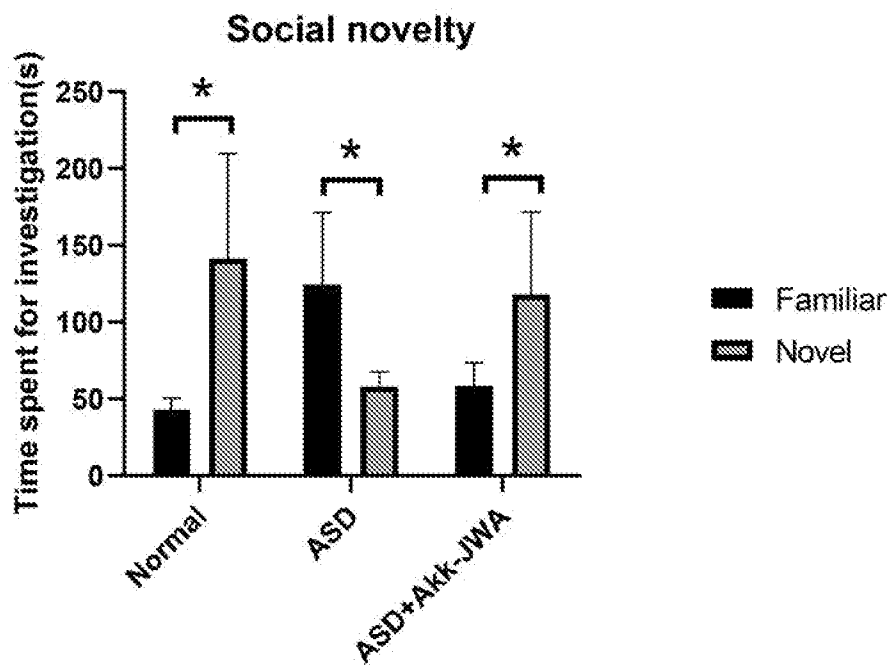


图12C

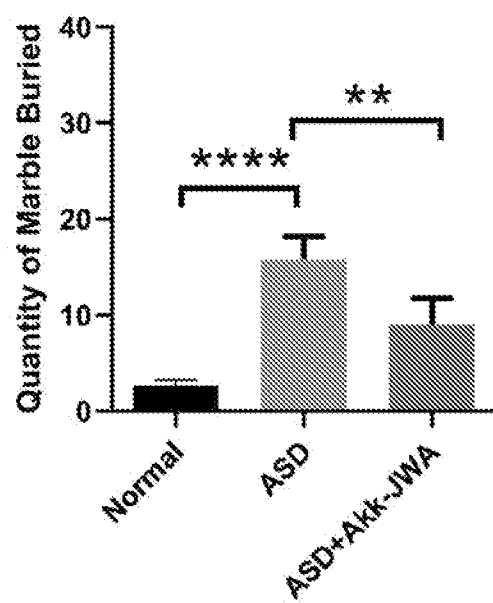


图13