



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120683114 A

(43) 申请公布日 2025. 09. 23

(21) 申请号 202511189676.4

A61K 49/00 (2006.01)

(22) 申请日 2025.08.25

C12N 15/74 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12N 15/65 (2006.01)

CCTCC NO:M 20251508 2025.07.02

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 临沂大学

地址 276000 山东省临沂市兰山区工业大道北段西侧

(72) 发明人 王培坤 张兴林 倪维是 张驰
叶斌 马俊飞 薛聪

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

专利代理师 周亮

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

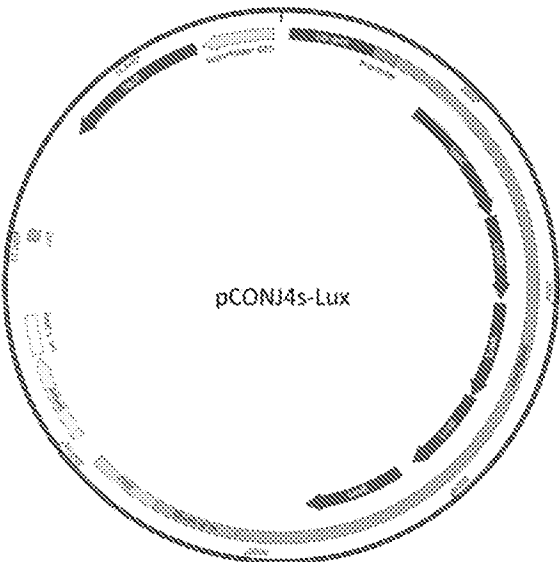
权利要求书1页 说明书13页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用

(57) 摘要

本申请公开了一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用。属于基因工程技术领域。本申请首次筛选出可用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的强启动子,其具备超强表达量。同时构建了一个可以将Lux CDABE的报告系统插入到嗜黏蛋白阿克曼菌的重组质粒,在此基础上,建立了一种将Lux CDABE的报告系统利用双交换的方式重组到嗜黏蛋白阿克曼菌基因组的方法,并成功构建得到一株能够发光的Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株,研究发现该菌株发光强度与菌株数量强相关,填补了AKK菌没有活体荧光成像构建方法的空白。



1. 一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1,其特征在于,所述启动子P1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

或由SEQ ID NO.2所示的序列经过一个或多个碱基的替换、缺失和/或添加后,仍保持启动子活性的核苷酸序列所示。

2. 一种重组载体,其特征在于,所述重组载体包括权利要求1所述的启动子P1序列;还包括与受体菌或受体细胞同源的上下游同源臂序列、Lux CDABE表达盒序列以及抗性筛选序列。

3. 根据权利要求2所述的重组载体,其特征在于,所述重组载体为pCONJ4s-Lux,其核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示。

4. 一种重组菌,其特征在于,所述重组菌包含权利要求1所述的启动子或权利要求2-3任一所述的重组载体。

5. 根据权利要求4所述的重组菌,其特征在于,所述重组菌为*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2025.07.02,保藏编号为CCTCC NO:M 20251508。

6. 权利要求4-5任一所述重组菌的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 筛选嗜黏蛋白阿克曼菌强启动子,其序列如SEQ ID NO.2所示;

(2) 设计上下游同源臂、P1启动子、Lux CDABE表达盒和抗性筛选表达盒引物,并扩增相应片段,备用;

(3) 以pCONJ4s作为骨架质粒,单酶切后与步骤(2)扩增片段进行同源重组,获取同源重组载体;

(4) 采用双交换法获取重组菌。

7. 一种活体成像系统,其特征在于,包括权利要求4-5任一所述的重组菌。

8. 权利要求1所述启动子P1的应用,其特征在于,所述应用为以下任一方向:

(1) 在嗜黏蛋白阿克曼菌基因工程中的应用;

(2) 在构建将Lux CDABE 细菌生物发光报告系统导入到嗜黏蛋白阿克曼菌体内的重组质粒中的应用;

(3) 在构建含有Lux CDABE 细菌生物发光报告系统的重组菌中的应用;

(4) 在构建含有Lux CDABE 细菌生物发光报告系统的活体成像系统中的应用;

(5) 在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

9. 权利要求2-3任一所述重组载体或权利要求4-5任一所述重组菌的应用,其特征在于,所述应用为以下任一方向:

(1) 在构建含有Lux CDABE 细菌生物发光报告系统的活体成像系统中的应用;

(2) 在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

10. 权利要求7所述的活体成像系统在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,更具体的说是涉及一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用。

背景技术

[0002] 嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*,简称AKK菌)是革兰阴性菌,人体肠道原籍厌氧菌。该菌以黏蛋白作为唯一碳源、氮源和能源来源,并可通过水解黏蛋白释放游离的硫酸盐,发酵产生乙酸和丙酸。AKK普遍定植于人体肠道中,约占人体主要微生物群落总数的0.5%~5%。研究表明,AKK在改善代谢性疾病(如肥胖、糖尿病)、限制炎症、抗衰老、辅助癌症免疫治疗等方面表现出不俗潜力,被誉为二代益生菌中的候选明星菌。

[0003] 目前,针对嗜黏蛋白阿克曼菌体内定植情况的检测,大多是采取小鼠粪便或者解剖后采集肠道内容物进行高通量测序方法,存在严重滞后性,无法实时反应AKK菌在体内实际复制及定殖情况。

[0004] Lux CDABE 系统是一种细菌生物发光报告系统,该系统有别于荧光素酶的生物发光报告系统和荧光报告系统,Lux CDABE 的报告系统具有无需添加底物,发光信号强,信噪比高优势,可实时反应细菌生长水平,目前在很多细菌活体成像中的到广泛应用。

[0005] 嗜黏蛋白阿克曼菌,其生长速度缓慢,遗传操作困难、且外源基因在其体内难以稳定表达,阻滞了AKK菌在基因层面的技术发展,导致目前不存在AKK菌外源基因表达的相关研究。也鲜有关于AKK菌外源基因启动子及活体荧光成像构建方法及相关研究的报道。

[0006] 因此,如何针对嗜黏蛋白阿克曼菌,研发相应的启动子以及外源基因编辑系统,开发相应的活体成像技术,是本领域技术人员亟待解决的技术问题。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供了一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用,针对AKK菌遗传操作困难、外源基因难以稳定表达的问题,成功筛选出高表达启动子P1,并创新设计pCONJ4s-Lux重组质粒,通过双交换重组技术将发光系统精准整合至基因组,攻克了该菌外源基因稳定表达的难题,成功构建了AKK发光菌株 *Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux,首次实现活体动物内AKK菌定植过程的非侵入式、连续性可视化监测。

[0008] 本申请的第一目的在于提供:一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1,所述启动子P1的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0009] 或由SEQ ID NO.2所示的序列经过一个或多个碱基的替换、缺失和/或添加后,仍保持启动子活性的核苷酸序列所示。

[0010] 本申请的再一目的在于提供:一种重组载体,所述重组载体包括所述的启动子P1序列;还包括与受体菌或受体细胞同源的上下游同源臂序列、Lux CDABE表达盒序列以及抗

性筛选序列。

[0011] 在一个实施例中,所述重组载体为pCONJ4s-Lux,其核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示。

[0012] 本申请的再一目的在于提供:一种重组菌,所述重组菌包含所述的启动子或所述的重组载体。

[0013] 在一个实施例中,所述重组菌为*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2025.07.02,保藏编号为CCTCC NO:M 20251508。

[0014] 本申请的再一目的在于提供:所述重组菌的构建方法,包括如下步骤:

[0015] (1) 筛选嗜黏蛋白阿克曼菌强启动子,其序列如SEQ ID NO.2所示;

[0016] (2) 设计上下游同源臂、P1启动子、Lux CDABE表达盒和抗性筛选表达盒引物,并扩增相应片段,备用;

[0017] (3) 以pCONJ4s作为骨架质粒,单酶切后与步骤(2)扩增片段进行同源重组,获取同源重组载体;

[0018] (4) 采用双交换法获取重组菌。

[0019] 本申请的再一目的在于提供:一种活体成像系统,包括所述的重组菌。

[0020] 本申请的再一目的在于提供:所述启动子P1的应用,所述应用为以下任一方向:

[0021] (1) 在嗜黏蛋白阿克曼菌基因工程中的应用;

[0022] (2) 在构建将Lux CDABEDE 细菌生物发光报告系统导入到嗜黏蛋白阿克曼菌体内的重组质粒中的应用;

[0023] (3) 在构建含有Lux CDABEDE 细菌生物发光报告系统的重组菌中的应用;

[0024] (4) 在构建含有Lux CDABEDE 细菌生物发光报告系统的活体成像系统中的应用;

[0025] (5) 在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

[0026] 本申请的再一目的在于提供:所述重组载体或所述重组菌的应用,所述应用为以下任一方向:

[0027] (1) 在构建含有Lux CDABEDE 细菌生物发光报告系统的活体成像系统中的应用;

[0028] (2) 在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

[0029] 本申请的再一目的在于提供:所述的活体成像系统在基于活体成像技术实时反映嗜黏蛋白阿克曼菌体内增殖、定植情况中的应用。

[0030] 经由上述的技术方案可知,与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0031] 1) 本发明提供了一种用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的启动子P1、重组载体及其重组菌和应用,针对AKK菌遗传操作困难、外源基因难以稳定表达的问题,首次成功筛选出高表达启动子P1,其具备超强表达量,长度仅238bp却实现超高活性,比传统长启动子(>500bp)更易于基因工程载体构建,兼具高效与便捷性。

[0032] 2) 此外,本申请创新设计了pCONJ4s-Lux重组质粒,通过双交换重组技术将发光系统精准整合至AKK菌基因组中,攻克了该菌外源基因难以稳定表达的难题,成功构建了AKK发光菌株*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux,首次实现活体动物内AKK菌定植过程的非侵入式、连续性可视化监测。

[0033] 3) 本申请在重组发光菌株构建的过程中,选择了一个AKK的 β -内酰胺酶基因作为插入位点,这个基因被破坏不影响AKK菌的生长,且本申请采用的是无痕插入方法,最后只会保存启动子+Lux,不会残留其他基因。

附图说明

[0034] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0035] 图1为:嗜黏蛋白阿克曼菌重组质粒pCONJ4s-Lux。

[0036] 图2为:活体成像仪观察到的含重组质粒pCONJ4s-Lux的供体菌SM10 λ pir感受态细胞。

[0037] 图3为:供体菌受体菌有氧接合过程。

[0038] 图4为:活体成像仪观察到的Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株。

[0039] 图5为:Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株与野生型菌株SDLYAKK8体外生长曲线。

[0040] 图6为:Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株发光亮度与菌株数量关系。

[0041] 图7为:不同时间Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株在小鼠体内定植情况。

[0042] 图8为:Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux菌株主要定植于小鼠结肠。

具体实施方式

[0043] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中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前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0044] 本申请实施例所用材料如下:

[0045] 含有Lux CDABE发光表达盒的质粒pBBR1MCS4-LuxCDABE:从武汉淼灵生物科技有限公司购买。

[0046] 骨架质粒pCONJ4s:由本实验室保存,在Liu G, Beaton SE, Grieve AG, Evans R, Rogers M, Strisovsky K, Armstrong FA, Freeman M, Exley RM, Tang CM. Bacterial rhomboid proteases mediate quality control of orphan membrane proteins. EMBO J. 2020 May 18;39(10):e102922. doi: 10.15252/emboj.2019102922. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32337752; PMCID: PMC7232013,中公开了该骨架质粒及相应构建方法。

[0047] 嗜黏蛋白阿克曼菌SDLYAKK8菌株:该菌株已在论文“嗜黏蛋白阿克曼菌分离株全基因组及生物学特性分析”中公开。Genbank 登录号:CP115935。现由申请人持有,可以为了满足专利公开充分性的要求向公众提供。

[0048] 此外,本申请所用的出发菌株可以为除嗜黏蛋白阿克曼菌SDLYAKK8菌株以外的其

他嗜黏蛋白阿克曼菌株,只要所选菌株基因组序列含有如SEQ ID NO.1所示的序列即可。

[0049] Ttattcttttccggcgaggtctccactccatgcacagccagcgggcatggaggcaatcacccggtcacaagcggattcagaatcctttgaatccctgataaacacggaaaccgccattttccggccgttggaagaacaatgatgccgacgtcattgcgggcggtaacgccaccccccggcagcgtgaatccggatcccgtcttatgcccaccacgtaatcccgcggcagctgccctttcaaagttcagggcctgtagagcaccccgccatgataccccaagaaaattctgtgtacccttgcagaaatttaccttcgtcaaacgcccggagcagggagttcatggccgacggacggcttgagttgacatattgcaaatcatgattccggtgtattttcttcttcgtaaaacggacattaatgccgtcaattccccattcc ttcaaatecttctgcacggcctgcgggccctccaataagggcaaacaggaggtcgaggtgtttgttgctgctttcctggacagtcactctcagcagttccttcagagagaaatcgccgccttgcgggaaacgctcccggagggggctccaggtatctttcaccagttgttccggacgtatgcggatgatctgttccagattcatggcgccctgggtccaccgcgttcaagacagacaagggcagcacgaatttgacgacgctctgcatgggataggccgcctcatccccaccatgacggtttccc cegtatccagcattttccgcagccatgcccacacgggccttcagggaatgggccagttcgcgtaaggcgagggaatc cgctgcggaaacggctggcgaggagaagacgtggccccctgagaaaaacgcaaaagaacat,SEQ ID NO.1。

[0050] 质粒PBAD33:从上海泽叶生物科技有限公司购买。

[0051] SM10 λ pir感受态细胞:从上海雅吉生物科技有限公司购买。

[0052] 实施例1

[0053] 用于嗜黏蛋白阿克曼菌外源基因表达的强启动子的筛选

[0054] 将嗜黏蛋白阿克曼菌SDLYAKK8在液体培养基培养到对数期后,4°C、12000转/min离心10分钟后弃上清,沉淀液氮速冻后送上海派森诺生物科技有限公司对转录组进行分析,筛选出mRNA表达量最高的基因的启动子为目标启动子,经测定P1启动子的核苷酸序列如下所述:

[0055] P1启动子核苷酸序列:

[0056] GTTCCTACCGTGCTCAAGAAGGCGCCCCATGCAAGCCGGCGCTCCGTACGTGCCCCGGACTGTCAAACTTACCCCGGAGGCCAAAAGCGCGTCCTCATCAAAAAAACC GCCCTAAAAAGAATCCTCTCCGCGTATTTTTTTGAACAAAAATCACTCCCTGCCGCTCTATCTGTCTAGAACGGCAGCTCTTCTGCCGCTGCATTACCAACACCACAC AACCTCATATATCATTAT,SEQ ID NO.2。

[0057] 表1 嗜黏蛋白阿克曼菌强启动子

[0058]	启动子	对应基因功能	表达量	启动子长度 (bp)
	P1	hypothetical protein	258174.87	238

[0059] 实施例2

[0060] 构建表达发光系统Lux CDABE蛋白的嗜黏蛋白阿克曼菌重组质粒

[0061] (1)骨架质粒单酶切

[0062] 将保存于-80°C含有pCONJ4s质粒的S17-1 λ pir感受态细胞,划线,接种于含有amp抗性的LB营养琼脂板中,过夜培养,待长出单菌落后挑取单菌落于含有amp抗性的LB液体培养基中,过夜培养后取5mL菌液按照诺唯赞质粒小提取试剂盒说明书步骤抽提质粒。测得浓度后按照NEB公示PmeI 快切酶说明书酶切质粒,凝胶电泳后按照诺唯赞凝胶电泳回收试剂盒回收单酶切产物,测浓度后-20°C保存备用。

[0063] (2) 同源臂、抗性表达盒、发光表达盒扩增回收

[0064] 设计上游同源臂Up-arm引物,P1启动子引物,Lux CDABE表达盒引物,下游同源臂引物Down-arm,氯霉素表达盒引物,具体引物序列如表2所示。

[0065] 表2构建重组质粒所用引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
Up-arm 引物	P11F aaaacgacggccagtggttaaacAAACATCTTTTCTTAAAGAGAATAAAA AAACA, SEQ ID NO.3
	P11R ggtaggggaacGGGTATCATGGCGGGGTG, SEQ ID NO.4
P1 启动子引物	P12F catgatacccGTTCCTACCGTGCCTCAAGA, SEQ ID NO.5
	P12R cATAATGATATGTGAGGTTGTGTGGTG, SEQ ID NO.6
Lux CDABE 表达盒引物	P13F caacctcacatatcattatGAATTCTTCTTTAGAAATCTGCCGG, SEQ ID NO.7
	P13R ctttgGAATTCCTTTAATCCCTTTAATTCCT, SEQ ID NO.8
Down-arm 引物	P14F ggattasaggasttcCAAAGAAAATTCTGTGTACCCCTTG, SEQ ID NO.9
	P14R atatcaagGAGCGTGCCGATCAGCCC, SEQ ID NO.10
氯霉素表达盒引物	P15F atcggcacgctcCTTGATAATGGCTTTTATATGTGTACTCT, SEQ ID NO.11
	P15R ggaaacagctatgacgttaaacTTATAAAAGCCAGTCATTAGGCCTAT, SEQ ID NO.12

其中上游同源臂、启动子、以及下游同源臂所用模板为菌株SDLYAKK8基因组DNA,氯霉素表达盒所用模板为质粒PBAD33(自上海泽叶生物科技有限公司购买),Lux CDABE表达盒所用模板为质粒pBBR1MCS4-LuxCDABE(从武汉淼灵生物科技有限公司购买)。

[0067] 采用诺唯赞高保真酶扩增相应产物,相应扩增体系如表3所示。按以下条件进行PCR反应,98℃,5min预变性;95℃,30s变性;58℃,30s退火;72℃,2min延伸;30个循环后,再延伸72℃,7min,4℃,10min。

[0068] 表3 PCR扩增反应体系

[0069]

反应液组成	体积
引物 1	2ul
引物 2	2ul
mix	25ul
cDNA 模板	2ul
灭菌水	19ul
总体积	50ul

[0070] 随后将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,随后利用胶回收试剂盒纯化片段,测浓度。将纯化后的pCONJ4s单酶切产物、上游同源臂、启动子、Lux CDABE表达盒引物、下游同源臂、氯霉素表达盒的产物按照诺唯赞多片段同源重组试剂盒的说明,进行同源重组,即为可用于构建表达发光系统Lux CDABE蛋白的嗜黏蛋白阿克曼菌重组质粒pCONJ4s-Lux (图1);所述重组质粒的核苷酸序列如下:ttcactaaataatagtgaacggcaggtatatgtgatgggttaaaaagga tcttaagcggagtataGTAAACGACGCCAGTGTTTAaacatcttttcttaaagagaataaaaaacatcgagtta aaaaattaaatttggacaacaaagaaggaatttagcgaaaattatcaacaaatacaattttatttcgggatggaaaaac ggaaacagacggttccttttatagggaatctgggtatatttcatattataataaaaaaaccttattttattgttc atggcatataataccaaacacattcatctttttgacaagaaaaaattggaggtgaagaatatacgaagaagctct tttggttacaagaaagggacaacaagagtgggttagaagttcgagtatttgaattagaaccgctgtatttgggaatt ggaaaagtctcttgaaaggatttcatctcctgttatagaaaaagataaataaaaaacaataatatcgtttctcaac atgtagaacatgtgattaatatataaaatgggattgtttactttatttgcctcatccaagcaatgtgctgaatatcaa aagccagaatcctttgaaaatctgacgccaagactgttctgcatcatccggttatcttttccggcggcaggtctc cactccatgcacagccagcgggcatggaggcaatcacccggtcacaagcggattcagaatcctttgaatccctga taaacacggaaaccgccattttccggccggttggaagaacaatgatgccgacgtcattgcggggcggttaacgccacc ccccggcagcgtgaatccggatcccgtcttatgcccaccacgtaatcccgcggcagctgccccttcaaacgttca gggcctgtagagcaccccgccatgatacccGTTCCCTACCGTGCCTCAAGAAGGCGCCCCATGCAAGCCGGCGCTC CGTACGTGCCCCGGACTGTCAAACCTACCCCGGAGGCCAAAAGCGCGTCCTCATCAAAAAACCGCCCTAAAAAG AATCCTCTCCGCGTATTTTTTTGAACAAAAATCACTCCCTGCCGCTCTATCTGTCGTAGAACGGCAGCTCTTCTGC CGCTGCATTACCAACACCACACAACCTCACATATCATTATGAATTCTTCTTTAGAAATCTGCCGGTAAAAATTAGA TTGCTATTCAATCTATTTCTATCGGTATTTGTGAAATAATACTCAGGATAATAATTTACATAAATATTATCACGCA TTAGAGAAGAGCATGACTTTTTTAATTTAACTTTTCATTAACAAATCTTGTTGATATGAAAATTTTCCTTTGCTA TTTTAACAGATATTAACCGGAATAGGCGTTATATTGACGATCCATTAGTTAGATTAAAAACCTTGAGCAGAAA ATTTATATTATTATCATAATTATGACGAAAGTTACAGGCCAGGAACCGTAGTCAGAATCTGATTTTCTATATAT TTGTTATTTACATCGTCATAACACAAAAATATAAGAAGCAAGTGTGGTACGACCAGTTCGCAAGATAGTTAAACA GCAACTTAAGTTGAAATTACCCCATTAATGGATGGCAAATATGACTAAAAAAATTTTCATTTCATTATTAACGGCC AGGTTGAAATCTTTCCCGAAAAGTGATGATTTAGTGCAATCCATTAATTTTGGTGATAATAGTGTTTACCTGCCAAT ATTGAATGACTCTCATGTAAAAAACATTATTGATTGTAATGGAAATAACGAATTACGGTTGCATAACATTGTCAAT

TTTCTCTATACGGTAGGGCAAAGATGGAAAAATGAAGAATACTCAAGACGCAGGACATACATTTCGTGACTTAAAA
AATATATGGGATATTCAGAAGAAATGGCTAAGCTAGAGGCCAATTGGATATCTATGATTTTATGTTCTAAAGGCGG
CCTTTATGATGTTGTAGAAAAAGAACTTGGTTCTCGCCATATCATGGATGAATGGCTACCTCAGGATGAAAGTTAT
GTTTCGGGCTTTTCCGAAAGGTAAATCTGTACATCTGTTGGCAGGTAATGTTCCATTATCTGGGATCATGTCTATAT
TACGCGCAATTTTAACTAAGAATCAGTGTATTATAAAAAACATCGTCAACCGATCCTTTTACCGCTAATGCATTAGC
GTTAAGTTTTATTGATGTAGACCCTAATCATCCGATAACGCGCTCTTTATCTGTTATATATTGGCCCCACCAAGGT
GATACATCACTCGCAAAAGAAATTATGCGACATGCGGATGTTATTGTGCTTGGGGAGGGCCAGATGCGATTAATT
GGGCGGTAGAGCATGCGCCATCTTATGCTGATGTGATTAAATTTGGTTCTAAAAAGAGTCTTTGCATTATCGATAA
TCCTGTTGATTTGACGTCCGAGCGACAGGTGCGGCTCATGATGTTTGTGTTTACGATCAGCGAGCTTGTTTTCT
GCCCCAAACATATATTACATGGGAAATCATTATGAGGAATTTAAGTTAGCGTTGATAGAAAACTTAATCTATATG
CGCATATATTACCGAATGCCAAAAAGATTTTGATGAAAAGGCGGCCTATTCTTTAGTTCAAAAAGAAAGCTTGTT
TGCTGGATTAAAAGTAGAGGTGGATATTCATCAACGTTGGATGATTATTGAGTCAAATGCAGGTGTGGAATTTAAT
CAACCACTTGGCAGATGTGTGTACCTTCATCACGTCGATAATATTGAGCAAATATTGCCCTTATGTTCAAAAAATA
AGACGCAAACCATATCTATTTTTCCTTGGGAGTCATCATTTAAATATCGAGATGCGTTAGCATTAAGGTGCGGA
AAGGATTGTAGAAGCAGGAATGAATAACATATTTGAGTTGGTGGATCTCATGACGGAATGAGACCGTTGCAACGA
TTAGTGACATATATTTCTCATGAAAGGCCATCTAACTATACGGCTAAGGATGTTGCGGTTGAAATAGAACAGACTC
GATTCCTGGAAGAAGATAAGTTCCTTGTTGTTGTTCCATAATAGGTAAGTATGGAAAAATGAATCAAAATATAAA
ACCATCGACCACGTTATTTGTGTTGAAGGAAATAAAAAATTCATGTTTGGGAAACGCTGCCAGAAGAAACAGCC
CAAAGAGAAAGAATGCCATTATTTATGCGTCTGGTTTGGCCGAGGATGGATCATTTTGCTGGTCTGGCGGAATA
TTTATCGCGGAATGGATTTTCATGTGATCCGCTATGATTGCTTCACCACGTTGGATTGAGTTCAGGGACAATTGAT
GAATTTACAATGTCTATAGGAAAGCAGAGCTTGTTAGCAGTGGTTGATTGGTTAACTACAGAAAAATAAATAACT
TCGGTATGTTGGCTTCAAGCTTATCTGCGCGGATAGCTTATGCAAGCCTATCTGAAATCAATGCTTCGTTTTAAT
CACCGCAGTCGGTGTTGTTAACTTAAGATATTCTCTGAAAGAGCTTTAGGGTTGATTATCTCAGTCTACCCATT
AATGAATTGCCGATAATCTAGATTTTGAAGGCCATAAATTGGGTGCTGAAGTCTTTGCGAGAGATTGTCTTGATT
TTGGTTGGGAAGATTTAGCTTCTACAATTAATAACATGATGTATCTTGATATACCGTTTATTGCTTTTACTGCAAA
TAACGATAAATTGGGTCAAGCAAGATGAAGTTATCACATTGTTATCAAAATATTCGTAGTAATCGATGCAAGATATAT
TCTTTGTTAGGAAGTTCGCATGACTTGAGTGAAAATTTAGTGGTCTGCGCAATTTTATCAATCGGTTACGAAAG
CCGCTATCGCGATGGATAATGATCATCTGGATATTGATGTTGATATTACTGAACCGTCATTTGAACATTTAACTAT
TGCGACAGTCAATGAACGCCGAATGAGAATTGAGATTGAAAAATCAAGCAATTTCTCTGTCTTAAAATCTATTGAGA
TATTCTATCACTCAAATAGCAATATAAGGACTCTCTATGAAATTTGGAAAATTTTGCTTACATACCAACCTCCCC
AATTTTCTCAAACAGAGGTAATGAAACGTTTGGTTAAATTAGGTGCGATCTCTGAGGAGTGTGGTTTTGATACCGT
ATGGTTACTGGAGCATCATTTACGGAGTTTGGTTTGGTTGTTAACCCTTATGTCGCTGCTGCATATTTACTTGGC
GCGACTAAAAAATTGAATGTAGGAACTGCCGCTATTGTTCTTCCACAGCCCATCCAGTACGCCAATTGAAGATG
TGAATTTATTGGATCAAATGTCAAAAGGACGATTTTCGGTTTGGTATTTGCCGAGGGCTTTACAACAAGGACTTTTCG
CGTATTCGGCACAGATATGAATAACAGTCGCGCCTTAGCGGAATGCTGGTACGGGCTGATAAAGAATGGCATGACA
GAGGGATATATGGAAGCTGATAATGAACATATCAAGTTCCATAAGGTAAAAGTAAACCCCGCGGCGTATAGCAGAG
GTGGCGCACCGGTTTATGTGGTGGCTGAATCAGCTTCGACGACTGAGTGGGCTGCTCAATTTGGCCTACCGATGAT
ATTAAGTTGGATTATAAATACTAACGAAAAGAAAGCACAACTTGAGCTTTATAATGAAGTGGCTCAAGAATATGGG
CACGATATTCATAATATCGACCATTGCTTATCATATATAACATCTGTAGATCATGACTCAATTAAAGCGAAAGAGA

TTTGCCGGAATTTCTGGGCGATTGGTATGATTCTTATGTGAATGCTACGACTATTTTTGATGATTCAGACCAAAC
AAGAGTTATGATTTCAATAAAGGGCAGTGGCGTGACTTTGTATTAAGGACATAAAGATACTAATCGCCGTATT
GATTACAGTTACGAAATCAATCCCGTGGGAACGCCGAGGAATGTATTGACATAATCAAAAAGACATTGATGCTA
CAGGAATATCAAAATTTGTTGTGGATTTGAAGCTAATGGAACAGTAGACGAAATTTATTGCTTCCATGAAGCTCTT
CCAGTCTGATGTCATGCCATTTCTTAAAGAAAAACAACGTTTCGCTATTATATTAGCTAAGGAGAAAGAAATGAAAT
TTGGATTGTTCTTCTTAACCTTCATCAATCAACAACCTGTTCAAGAACAAAGTATAGTTTCGCATGCAGGAAATAAC
GGAGTATGTTGATAAGTTGAATTTTGAACAGATTTTAGTGTATGAAATCATTTTTTCAGATAATGGTGTGTGCGC
GCTCCTCTGACTGTTTCTGGTTTTCTGCTCGGTTTAAACAGAGAAAAATAAAAATGGTTCATTAAATCACATCATT
CAACTCATCATCTGTGCGCATAGCGGAGGAAGCTTGCTTATTGGATCAGTTAAGTGAAGGGAGATTTATTTTAGG
GTTTAGTGATTGCGAAAAAAAAGATGAAATGCATTTTTTTAATCGCCCGGTTGAATATCAACAGCAACTATTTGAA
GAGTGTATGAAATCATTAACGATGCTTTAACAACAGGCTATTGTAATCCAGATAACGATTTTTATAGCTTCCCTA
AAATATCTGTAAATCCCCATGCTTATACGCCAGGCGGACCTCGGAAATATGTAACAGCAACCAGTCATCATATTGT
TGAGTGGGCGGCCAAAAAAGGTATTCCTCTCATCTTTAAGTGGGATGATTCTAATGATGTTAGATATGAATATGCT
GAAAGATATAAAGCCGTTGCGGATAAATATGACGTTGACCTATCAGAGATAGACCATCAGTTAATGATATTAGTTA
ACTATAACGAAGATAGTAATAAAGCTAAACAAGAGACGCGTGCAATTTATTAGTGATTATGTTCTTGAAATGCACCC
TAATGAAAATTTGAAAAATAAAGCTGAAGAAATAATTGCAGAAAACGCTGTGCGAAATTATACGGAGTGATAACT
GCGGCTAAGTTGGCAATTGAAAAGTGTGGTGCAGAAAAGTGTATTGCTGTCTTTGAACCAATGAATGATTTGATGA
GCCAAAAAATGTAATCAATATTGTTGATGATAATATTAAGAAGTACCACATGGAATATACCTAATAGATTTGAG
TTGCAGCGAGGCGGCAAGTGAACGAATCCCCAGGAGCATAGATAACTATGTGACTGGGGTGAGTGAAAGCAGCCAA
CAAAGCAGCAGCTTGAAAGATGAAGGGTATAAAGAGTATGACAGCAGTGCTGCCATACTTTCTAATATTATCTTG
AGGAGTAAACAGGTATGACTTCATATGTTGATAAACAAGAAATTACAGCAAGCTCAGAAATGATGATTTGATTT
TTTCGAGCGATCCATTAGTGTGGTCTTACGACGAGCAGGAAAAAATCAGAAAGAACTTGTGCTTGATGCATTTG
TAATCATTATAAACATTGTCGAGAATATCGTCACTACTGTGAGGCACACAAAGTAGATGACAATATTACGGAAATT
GATGACATACCTGTATTCCCAACATCGGTTTTTAAGTTTACTCGCTTATTAAGTTCTCAGGAAAACGAGATTGAAA
GTTGGTTTACCAGTAGCGGCACGAATGGTTTAAAAAGTCAGGTGGCGCGTGACAGATTAAGTATTGAGAGACTCTT
AGGCTCTGTGAGTTATGGCATGAAATATGTTGGTAGTTGGTTTGATCATCAATAGAAATTAGTCAATTTGGGACCA
GATAGATTTAATGCTCATAATATTTGGTTTAAATATGTTATGAGTTTGGTGAATTTGTTATATCCTACGACATTTA
CCGTAACAGAAGAACGAATAGATTTTGTTAAAACATTGAATAGTCTTGAACGAATAAAAAATCAAGGGAAAGATCT
TTGTCTTATTGGTTCGCCATACTTTATTTATTTACTCTGCCATTATATGAAAGATAAAAAAATCTCATTTTCTGGA
GATAAAAGCCTTTATATCATAACCGGAGGCGGCTGGAAGGTTACGAAAAAGAAATCTCTGAAACGTGATGATTTCA
ATCATCTTTTATTTGATACTTTCAATCTCAGTGATATTAGTCAGATCCGAGATATATTTAATCAAGTTGAACTCAA
CACTTGTTTTCTTTGAGGATGAAATGCAGCGTAAACATGTTCCGCCGTGGGTATATGCGCGAGCGCTTGATCCTGAA
ACGTTGAAACCTGTACCTGATGGAACGCCGGGGTTGATGAGTTATATGGATGCGTCAGCAACCAGTTATCCAGCAT
TTATTGTTACCGATGATGTCGGGATAATTAGCAGAGAATATGGTAAGTATCCCGCGTGCTCGTTGAAATTTTACG
TCGCGTCAATACGAGGACGCAGAAAGGTGTGCTTTAAGCTTAACCGAAGCGTTTGATAGTTGATATCCTTTGCCT
AATTGTAAGTGAATGCTTGCCTTATATAAATCTGAATGACATCTACACTTTACAAAATCTCCAAAACATCCACA
TTTGGGTACTTGATAGAGGTTTATGGGGTTGGCTTAACATTGTTCTCATTGTTATTATTGGCTCAAAGCAAAAGGA
GATAACATGAAAAAATTGGCAGTTATGCTTGCATTGGGAATGATTAGCTTTGGTGCAATGGCAGTTGATGGGTATA
AAGATGCAAAGTTTGGCATGACAGAAGAAGAGTTTCTTTCAAGAGGTTATGTGATTTTGAAAAATTTGAGGGAGA

11

ACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGA
AATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAatatactagatccggcccgatgcgtccgg
cgtagaggatctgaagatcagcagttcaacctgttgatagtagtactaagctctcatgtttcacgtactaagctc
tcatgtttaacgtactaagctctcatgttttaacgaactaaacctcatggctaacgtactaagctctcatggctaa
cgtactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgtttgaacaataaaattaatataaatcagcaacttaaa
tagcctctaaggttttaagttttataagaaaaaaagaatatataaggcttttaagcttttaaggtttaacggtt
gtggacaacaagccagggatgtaacgcactgagaagcccttagagcctctcaaagcaattttcagtacacaggaa
cacttaacggctgacatgggaattctactgtttgggtgtatgagctatttgcaaaggaaattgggtgatgacaaagc
tcggcgctatttgaagaaaatcgactatggcaacgccgatcctttttgtccggtgttgggttgaaggtgaagccgg
tcggggcccgagcggggccggcttttcagccttgccccctgcttcggccgcccgtggctccggcgtcttgggtgc
cggcgcgggttccgcagccttggcctgcggtgcgggcacatcggcgggcttggccttgatgtgccgcttggcgtgc
gagcggaacgtctcgtaggagaacttgaccttccccgtttcccgcatgtgctcccaaatggtgacgagcgcatagc
cggaecgtaacgccgctcgacatccgcccaccgcccaggaaacgaaccgcagcctcatcagccggcgcttctt
ggcgcgcgggattcaaccactcggccagctcgtcggtgtagctctttggcatcgctcttcgctgtccccctcag
ttcagtaatttctcgatgttgcctgtttccagtcggtagatatccacaaaacagcagggaagcagcgcttttccg
ctgcataacctgcttcggggtcattatagcgattttttcggtatatccatcctttttcgcacgatatacaggatt
ttgcaaagggttcgtgtagactttccttgggtgtatccaacggcgctcagccgggcaggataggtgaagtaggcccc
cccgcgagcgggtgttcccttcttactgtcccttatcgcacctggcggtgctcaacgggaatcctgctctgcgag
gctggccggctaccgccggcgtaacagatgagggaagcggttggtgatgaaaccaagccaaccaggaaggcgag
cccacctatcaaggtgtactgccttcagacgaacgaagagcgattgaggaaaaggcgggcgggcgccggcatgagc
ctgtcgccctacctgctggccgctcgccagggtacaaaatcacgggcgctcgtaggactatgagcacgtccgcgagc
tgccccgcataatggcgacctgggcccgttggcgggcctgctgaaactctggctcaccgacgacccgcgcacggc
gcggttcggtgatgccacgatccgggcaacgttgttgcattgctgcagttcacttacaccgcttctcaaccgggt
acgcaccagaaaatcattgatattggccatgaatggcggttggtatgcgggcaacagcccgcattatgggcgttggcc
tcaacacgattttacgtcacttaaaaaactcaggccgcagtcggttaacctcgcgcatacagccgggcagtgacgtc
atcgtctgcgcggaaatggacgaacagtggggctatgtcggggctaaatcgcgccagcgctggctgttttacgcgt
atgacagctctccggaagacggttgttgcgcacgtattcggtgaacgcactatggcgacgctggggcgcttattag
cctgctgtcaccctttgacgtggtgatattggatgacggatggctggccgctgtatgaatcccgccctgaagggaag
ctgcacgtaatcagcaagcgatatacgcagcgaattgagcggcataacctgaatctgaggeagcacctggcacggc
tgggacggaagtcgctgtcgttctcaaaatcggtggagctgcatgacaaagtcacgggcattatctgaacataaa
acactatcaataagttggagtcattaccaaaagggttaggaatacgggttagccatttgctgttttatatagttca
tatgggattcacctttatgttgataagaaataaaagaaaatgccaataggatttatgttgaactgttaattgtcc
ttgttcaaggatgctgtctttgacaacagatgttttcttgcccttgatgttcagcaggaagcttggcgcaaacgtt
gattgtttgtctgcgtagaatcctctgtttgtcatatagcttgtaatacagacattgtttcccttcgcttgaggta
cagcgaagtgtgagtaagtaaaggttacatcgtaggatcaagatccatttttaacacaaggccagttttgttcag
cgcttgtatggggcagttaaagaattagaacataaccaagcatgtaaatatcgtagacgtaatgccgtcaatc
gtcatttttgatccgcgggagtcagtgaacagggtaccatttgccgttcatttttaagacgttcgcgcgttcaattt
catctgttactgtgttagatgcaatcagcggtttcatcacttttttcagtggtgtaatcatcggttagctcaatcat
accgagagcgccggttgctaactcagccgtgcgttttttatcgctttgcagaagttttgactttcttgacggaag

aatgatgtgcttttgccatagtatgctttgttaaataaagattcttcgccttggtagccatcttcagttccagtgt
ttgcttcaaataactaagtattttgtggcctttatcttctacgtagtgaggatctctcagcgtaggttgctgcctga
gctgtagttgccttcacgatgaactgctgtacattttgatacgttttccgtcaccgtcaaagattgatttataa
tcctctacaccgttgatgttcaaagagctgtctgatgctgatacgtttaacttggtgcagttgtcagtggttggtg
cgtaatgtttaccggagaaatcagtgtagaataaacggatttttccgtcagatgtaaattgtggctgaacctgacca
ttcttggtgtttggctcttttaggatagaatcatttgcacgaatttgcgctgtctttaaagacgaggccagcggtt
ttccagctgtcaatagaagtttcgccgactttttgatagaacatgtaaattcgatgtgtcatccgcatttttaggat
ctccggctaattgcaaagacgatgtggttagccgtgatagtttgcgacagtgccgtcagcggttttgtaattggccagct
gtcccaaacgtccaggccttttgcagaagagatattttaattgtggacgaatcgaattcaggaacttgatat
tcatttttttgctgttcagggatttgcagcatatcatggcgtgtaatatgggaaatgccgtatgtttccttatatg
gcttttggttcgtttctttcgcaaacgcttgagttgcgcctcctgccagcagtgcggtagtaaaggttaatactgt
tgcttggtttgcaaactttttgatgttcatATGTTCACTTACTCCATTATTGTGTAACATGTTatcggcattttctt
ttgcgtttTCATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTGTAATCCCAGCAGCAGTTACAACTCAAGAAGGACCATGT
GGTCACGCTTTTCGTTGGGATCTTTCGAAAGGACAGATTGTGTGACAGGTAATGGTTGTCTGGTAAAAGGACAGG
GCCATCGCCAATTGGAGTATTTTGTGATAATGGTCTGCTAGTTGAACGGATCCATCTTCAACGTTGTGGCGAATT
TTGAAGTTAGCTTTGATTCCATTCTTTTGTGTCTGCCGTGATGTATACATTGTGTGAGTTAAAGTTGTACTCAA
GTTTGTGTCCGAGAATGTTTCCATCTTCTTTAAAATCAATACCTTTTAACTCGATACGATTAACAAGGGTATCACC
TTCAAACCTTGACTTCAGCACGCGTCTTGTAAGTCCCGTCATCTTTGAAAGATATAGTGCCTTCCTGTACATAACCT
TCGGGCATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGCCGTTTCATATGATCCGGATAACGGGAAAAGCATTGAACACCATAAG
TGAGAGTAGTGACAAGTGTGGCCATGGAACAGGTAGTTTCCAGTAGTGCAAATAAATTTAAGGGTAAGCTTTCC
GTTTGTAGCATCACCTTCACCCTCTCCACGGACAGAAAATTTGTGCCCATTAACATCACCATCTAATTCAACAAGA
ATTGGGACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTGCTCATATGTTCACTTACTCCATTATTGTGTAACATGTTGGG
CTAGCATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGGTCAA,SEQ ID NO.13。

[0071] 实施例3

[0072] 双交换方法获得Akkermansia muciniphila SDLYAKK8-Lux发光菌株

[0073] (1) 供体菌的制备:

[0074] 将实施例2重组质粒pCONJ4s-Lux转化入供体菌SM10 λ pir感受态细胞体内, -80℃保存备用, 并通过活体成像系统观察发荧光细菌(图2)。

[0075] (2) 受体菌的培养:

[0076] 以嗜黏蛋白阿克曼菌SDLYAKK8菌株, 作为受体菌, 将受体菌从-80℃冰箱复苏, 培养到对数期, 备用。

[0077] (3) 供体菌受体菌培养接合

[0078] 分别取供体菌2mL, 受体菌1mL, 供体菌3000转/分钟, 离心3分钟, PBS重悬后重复离心2次后, 弃上清备用; 受体菌4℃条件下 5000转/分钟, 离心5分钟, PBS重悬后重复离心1次, 加200 μ L PBS重悬后与供体菌混匀后置于受体菌固体平板中, 放置于37℃恒温培养箱有氧接合8-12小时(图3)。

[0079] (4) 重组质粒双交换获得AKK发光菌株

[0080] 将接合子刮下后用2mL PBS 重悬, 随后均匀涂布到含有氯霉素抗性(6ng/ μ L)的受体菌琼脂平板, 厌氧培养96小时。生长出单菌落后, 置于活体成像仪观察, 有荧光菌株挑单

菌落扩大培养后,均匀涂布至含有蔗糖浓度8%受体菌平板中,继续厌氧培养,长出单菌落后置于活体成像仪观察,观察到的发光菌株即为完成双交换含有Lux CDABE发光系统的重组菌株*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux(图4),申请人对该菌株进行了保藏,保藏机构为中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2025.07.02,保藏编号为CCTCC NO:M 20251508,保藏地址为中国,武汉,武汉大学。

[0081] 实施例4

[0082] *Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux生长特性及发光亮度与菌株浓度关系

[0083] (1)*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株与野生型菌株SDLYAKK8生长能力对比

[0084] 首先测定*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株与野生型菌株SDLYAKK8生长能力是否有差异,取活化后*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株与野生型菌株SDLYAKK8,分别按照1:30接种量接种到液体培养基,每个菌株设三个重复。每隔4 h,无菌取菌液测量其OD₆₀₀,共测量36 h,随后绘制菌株在液体培养基中的生长曲线,实验结果如图5所示。

[0085] 结果分析:结果表明构建的*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株与野生型菌株SDLYAKK8在体外生长能力方面没有差异。

[0086] (2)*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株发光亮度与菌株数量关系

[0087] 将培养至对数期*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株,进行倍比稀释,随后用小动物活体成像系统(IVIS Lumina Series III)拍照,测得2、4、8、16和32倍稀释度下发光强度,随后对各稀释倍数菌液进行滴定计数,最后计算细菌数目与发光强度关系,进行相关性分析,实验结果如图6所示。

[0088] 结果分析:结果显示细菌数目与发光强度公式为:

[0089] 细菌CFU=145845×ROI+9×10⁸,相关系数R²=0.9711,两者强相关。

[0090] 实施例5

[0091] *Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株小鼠体内定植情况和定植部位研究

[0092] 通过*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux菌株灌胃小鼠,测定嗜黏蛋白阿克曼菌在小鼠体内定制能力,取8周龄SPF BALB/c小鼠,适应饲养1周后,四环抗生素(万古霉素+甲硝唑+硫酸新霉素+氨苄青霉素)灌胃1周,随后四环抗生素饮水3天,灌胃前2天更换为清水,灌胃前4小时禁食,随后将培养至对数期*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux取200uL灌胃(浓度为10⁹CFU/mL)灌胃后随即用小动物活体成像系统(IVIS Lumina Series III)拍照。随后正常饲养,每24小时拍照一次,观察*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux在小鼠体内定植情况,连续观察11天,实验结果如图7和图8所示。

[0093] 结果分析:结果表明可以通过活体成像系统,可实时观察嗜黏蛋白阿克曼菌在小鼠体内定植情况(图7)。对小鼠解剖,可以发现*Akkermansia muciniphila* SDLYAKK8-Lux主要定植于小鼠结肠部位(图8)。

[0094] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。

[0095] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。

对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

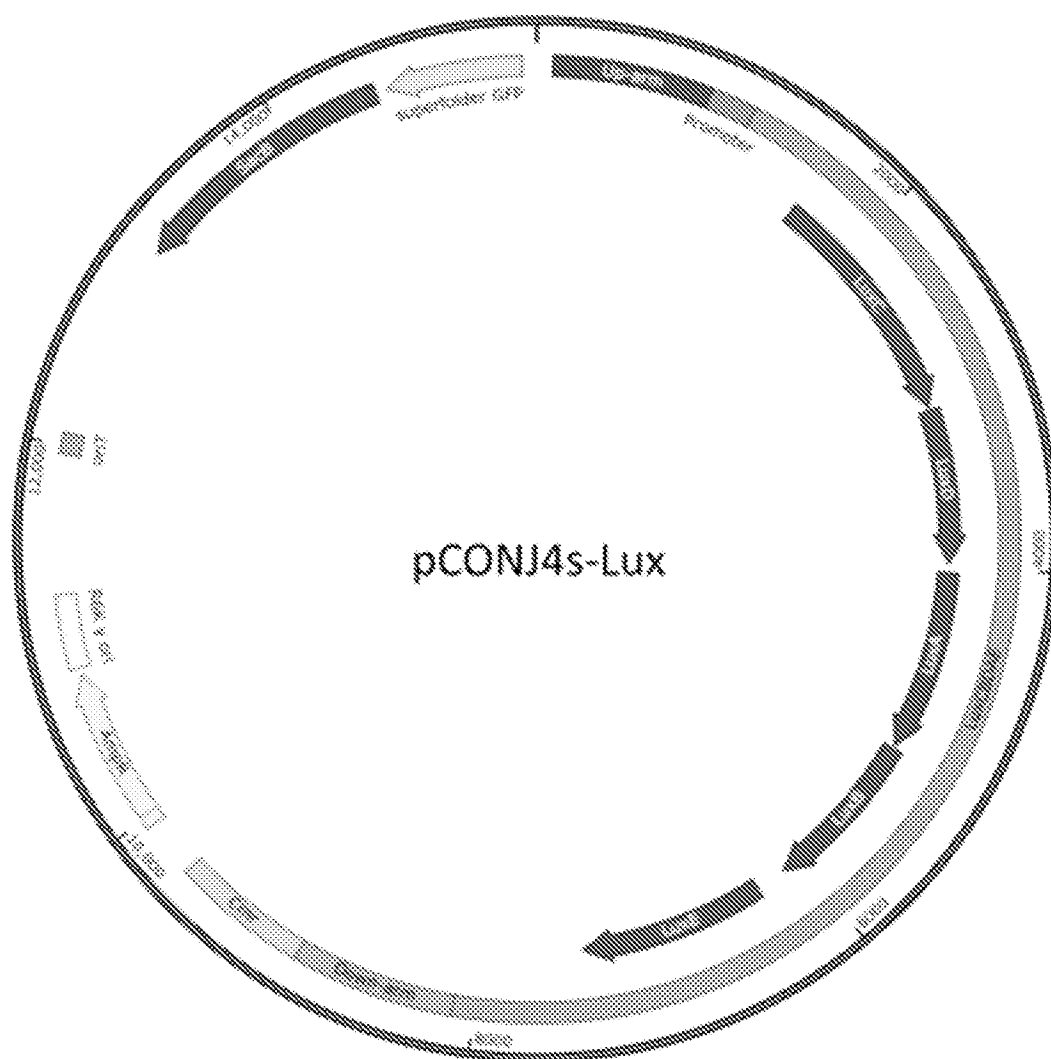


图 1

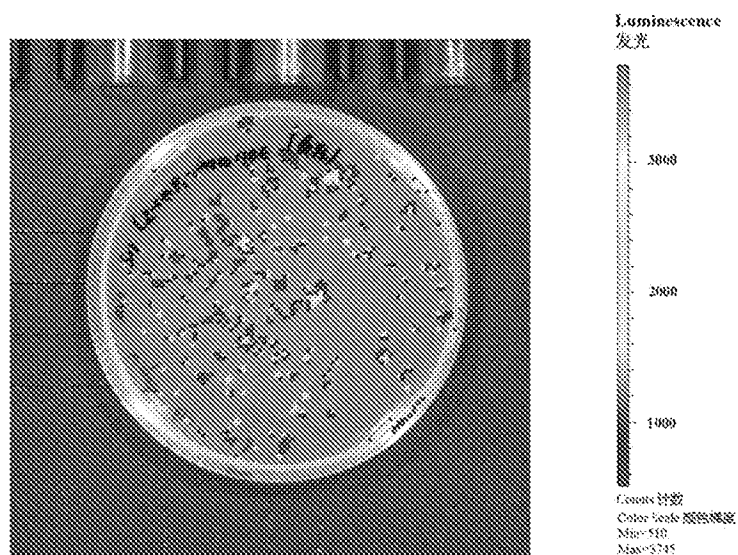


图 2

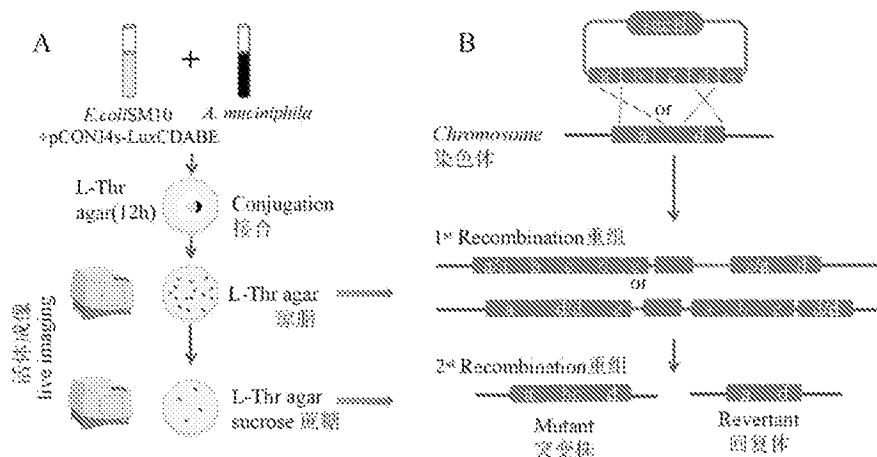


图 3

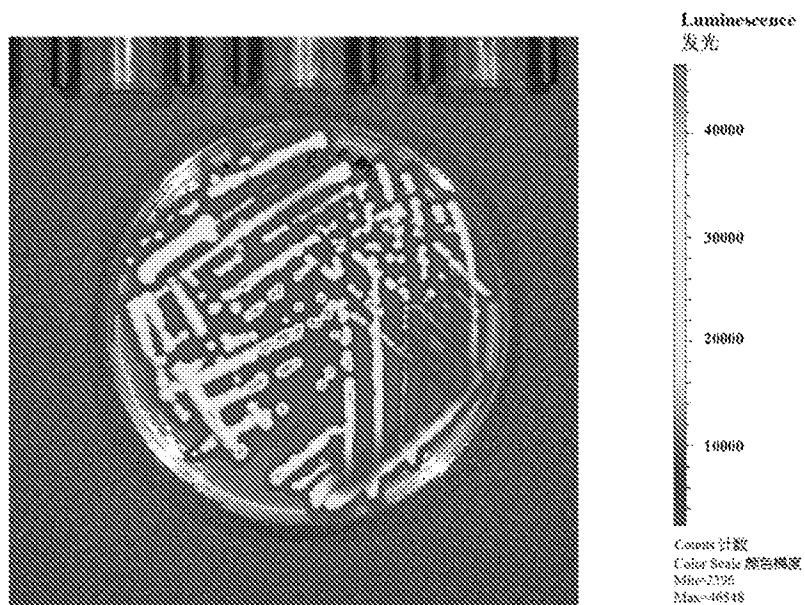


图 4

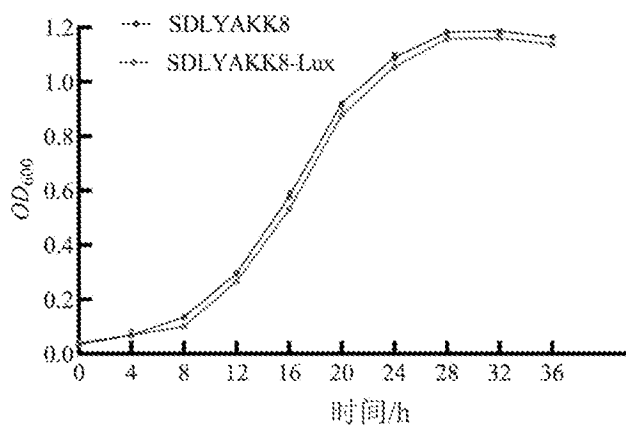


图 5

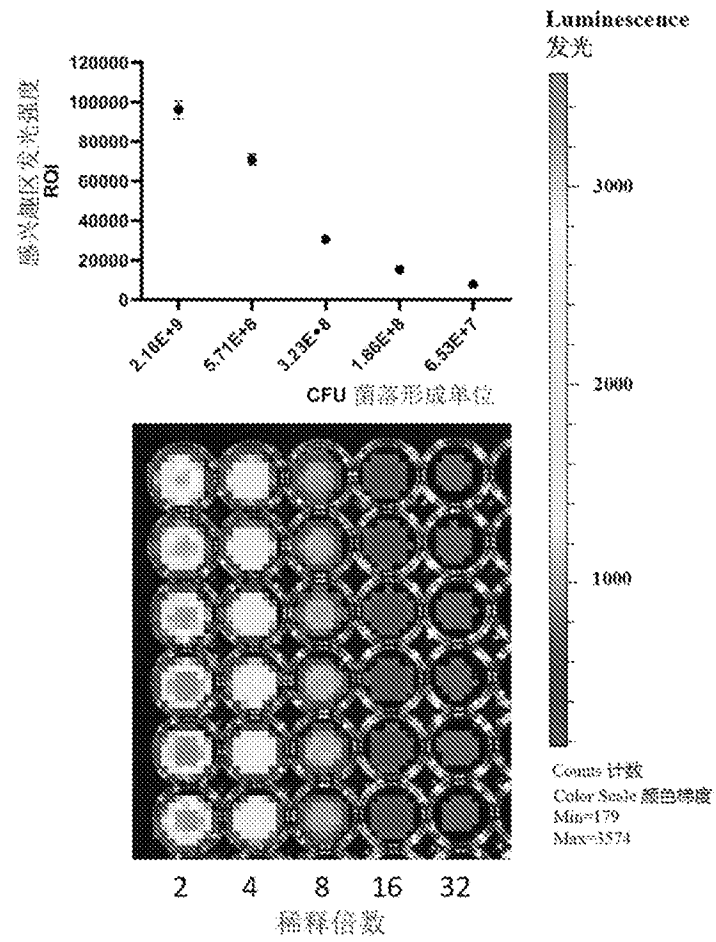


图 6

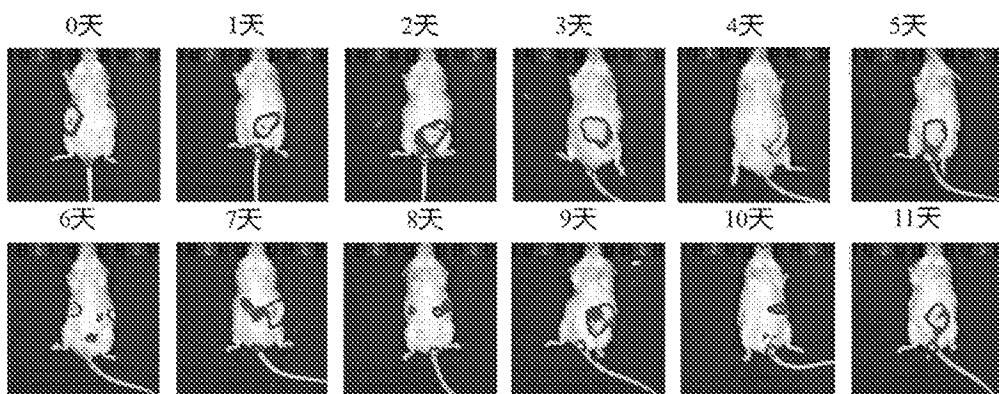


图 7

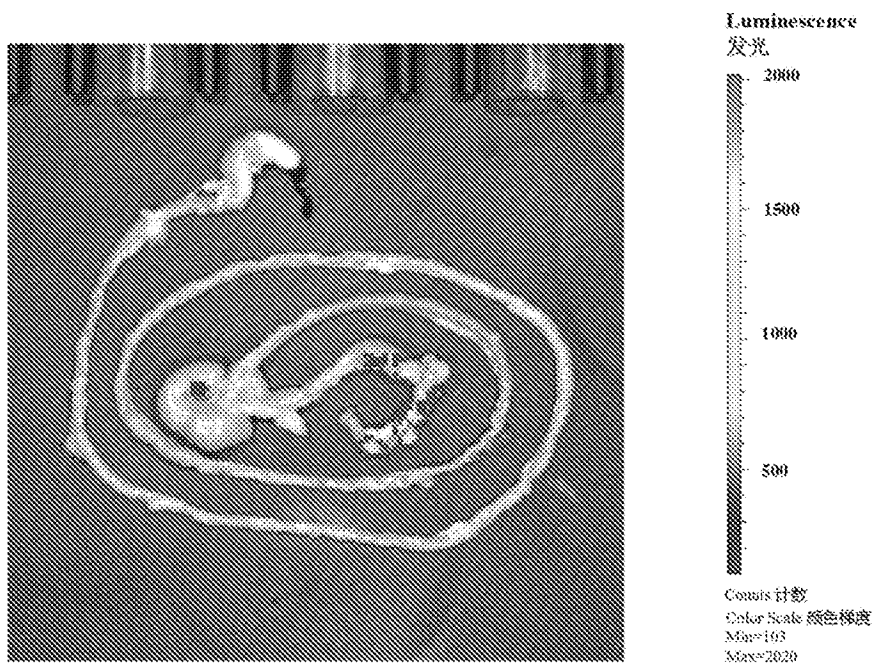


图 8