



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111465684 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 31

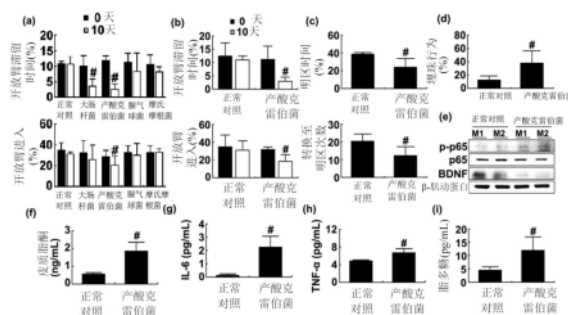
(21) 申请号 201880063145.2
 (22) 申请日 2018.09.28
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111465684 A
 (43) 申请公布日 2020.07.28
 (30) 优先权数据
 10-2017-0127422 2017.09.29 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.03.27
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2018/011607 2018.09.28
 (87) PCT国际申请的公布数据
 WO2019/066599 KO 2019.04.04
 (83) 生物保藏信息
 KCCM12090P 2017.08.04
 KCCM12297P 2018.08.03
 (73) 专利权人 庆熙大学校产学协力团
 地址 韩国京畿道
 专利权人 株式会社那笔制药

(72) 发明人 金东铉 韩明珠
 (74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
 专利代理师 马莉华 徐迅
 (51) Int.Cl.
 C12N 1/20 (2006.01)
 A23L 33/135 (2006.01)
 A61K 35/747 (2006.01)
 G12R 1/225 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 103209698 A, 2013.07.17
 KR 20140131505 A, 2014.11.13
 KR 20170090359 A, 2017.08.07
 US 2017191998 A1, 2017.07.06
 WO 2016168359 A1, 2016.10.20
 刘丹丹等. 肠道菌群与神经精神疾病. 《中国微生物学杂志》. 2017, (第07期),
 审查员 王溯铭
 权利要求书1页 说明书31页
 序列表7页 附图7页

(54) 发明名称
 新型乳酸菌及其应用

(57) 摘要

本发明涉及新型乳酸菌,更具体地,涉及用于预防或治疗颅神经和精神疾病或炎症疾病的组合物,其包含新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33 KCCM12090P或青春双歧杆菌NK98 KCCM 12297P。另外,本发明涉及用于诊断颅神经和精神疾病的组合物,其包括用于测量肠道微生物水平的试剂,包含该组合物的试剂盒以及用于诊断颅神经和精神疾病的方法,包括测量肠道微生物水平的步骤。



1. 一种罗伊氏乳酸杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) NK33, 保藏号为KCCM12090P。
2. 根据权利要求1所述的罗伊氏乳酸杆菌NK33, 其特征在于, 所述罗伊氏乳酸杆菌NK33包含SEQ ID NO:1的16S rDNA序列。
3. 根据权利要求1所述的罗伊氏乳酸杆菌NK33的用途, 用于制备用于预防或治疗神经性精神疾病的药物。
4. 根据权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述罗伊氏乳酸杆菌NK33是其活细菌细胞、其死细菌细胞、其培养物、其破碎物或其提取物。
5. 根据权利要求3所述的用途, 其特征在于, 所述药物还包含青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) NK98, 保藏号为KCCM12297P。
6. 根据权利要求5所述的用途, 其特征在于, 所述青春双歧杆菌NK98是其活细菌细胞、其死细菌细胞、其培养物、其破碎物或其提取物。
7. 根据权利要求3或5所述的用途, 其特征在于, 所述神经性精神疾病是神经退行性疾病或精神疾病。
8. 根据权利要求7所述的用途, 其特征在于, 所述精神疾病选自焦虑、抑郁、情绪障碍、失眠、妄想障碍、强迫症、偏头痛、应激、记忆障碍、认知障碍和注意力障碍中的一种或多种。
9. 根据权利要求7所述的用途, 其特征在于, 所述神经退行性疾病选自帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓小脑萎缩、图雷特氏综合症、弗里德里希共济失调、马查多·约瑟夫病、痴呆、肌张力障碍和进行性核上性麻痹中的一种或多种。
10. 根据权利要求3或5所述的用途, 其特征在于, 所述药物还包含青春双歧杆菌IM38, 保藏号为KCCM11807P。
11. 根据权利要求1所述的罗伊氏乳酸杆菌NK33的用途, 用于制备用于预防或治疗炎症性疾病的药物。
12. 如权利要求11所述的用途, 其特征在于, 所述药物还包含青春双歧杆菌NK98, 保藏号为KCCM12297P。

新型乳酸菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及新的乳酸菌,罗伊氏乳酸杆菌(*Lactobacillus reuteri*)或青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*),更特别地涉及包含用于预防和治疗神经性精神疾病或炎症疾病的新的乳酸菌的组合物。

[0002] 另外,本发明涉及用于诊断神经性精神疾病的组合物,其包含用于测量肠道微生物水平的制剂。

背景技术

[0003] 在现代社会中,由于压力的迅速增加,包括焦虑症、抑郁症、精神分裂症等的神经性精神疾病在增加。特别地,由于诸如个人主义的当今时代的社会和结构性原因之类的各种原因,患有诸如抑郁症和焦虑症的精神疾病的患者的数量正在增加。

[0004] 在严重的情况下,精神病患者可能最终会自杀。特别是,据报道,超过一半的抑郁症患者考虑自杀。事实上,已知有10%至15%这些患者自杀。

[0005] 精神疾病尚无明确客观的判断标准,因此其症状可能会因患者而异。如果怀疑有精神疾病,则需要根据准确的诊断和检查进行治疗。但是,现实情况是,由于社会对精神疾病的医院治疗持消极态度,所以没有进行适当的治疗。另外,如抗抑郁药等用于治疗精神疾病的药物尚未表现出令人满意的治疗效果,并且可能引起严重的副作用,例如心血管疾病,自杀等,因此这些药物的使用受到限制。

[0006] 另一方面,作为涉及使用天然产物的研究的结果,韩国专利公开号10-2017-0061457公开了使用木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)提取物和紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)提取物治疗精神疾病的组合物,但是仍然需要对能够治疗精神疾病的有效乳酸菌进行持续研究。

[0007] 在这样的背景下,本发明人在研究精神疾病的预防和治疗剂的同时确认了可以从肠道微生物群落的变化来诊断精神疾病,并且进一步确认了从人和小鼠的粪便中分离出的新型乳酸菌发挥抑制神经退行性疾病诱发因子、减轻焦虑和抑郁行为等作用,以致可以将新型乳酸菌用于预防或治疗神经性精神疾病,特别是神经退行性疾病和精神疾病,从而完成了本发明。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] (专利文献1)韩国专利公开号10-2017-0061457

[0011] 发明详述

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的目的是提供一种新型乳酸菌。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗神经性精神疾病的组合物,其包括新型乳酸菌。

[0015] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗炎症疾病的组合物,其包括新型乳酸

菌。

[0016] 本发明的另一个目的是提供用于诊断神经性精神疾病的组合物,其包含用于测量肠道微生物水平的制剂。

[0017] 本发明的另一个目的是提供诊断神经性精神疾病的方法,包括:测量粪便中的肠道微生物水平的步骤,该粪便分离自怀疑患有神经性精神疾病的个体;和比较所述肠道微生物水平和对照组粪便中的肠道微生物水平,而不是神经性精神疾病的水平的步骤。

[0018] 技术方案

[0019] 在实现上述目的的一个方面,本发明提供新型乳酸菌。

[0020] 具体地,在本发明中,所述新型乳酸菌可以是罗伊氏乳酸杆菌NK33(保藏机构:韩国微生物培养中心,保藏日期:2017年8月4日,保藏号:KCCM12090P)或青春双歧杆菌NK98(保藏机构:韩国微生物培养中心,保藏日期:2018年8月3日,保藏号:KCCM12297P)。

[0021] 本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98的特征在于,是从人或小鼠的粪便中分离和鉴定的新型乳酸菌。

[0022] 用于鉴定和分类根据本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33的16S rDNA序列与本说明书所附的SEQ ID NO:1相同。因此,根据本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33可以包括SEQ ID NO:1的16S rDNA。作为分析所述SEQ ID NO:1的16S rDNA序列的结果,该序列与已知罗伊氏乳酸杆菌菌株序列的同源性为99%,因此显示出与罗伊氏乳酸杆菌最高的分子系统发育关系。因此,所述乳酸菌被鉴定为罗伊氏乳酸杆菌,命名为罗伊氏乳酸杆菌NK33,并于2017年8月4日保藏在KCCM(保藏号:KCCM12090P)。

[0023] 根据本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33是革兰氏阳性细菌,并且其细胞类型是杆菌。更具体地,可以根据本领域中的常规方法来分析罗伊氏乳酸杆菌NK33的生理特性,其中其结果如下表3所示。特别地,罗伊氏乳酸杆菌NK33可以使用L-阿拉伯糖、D-核糖、D-木糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、N-乙酰基氨基葡萄糖、扁桃苷、熊果苷、七叶苷、水杨苷、纤维二糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、海藻糖、松三糖、棉子糖、龙胆二糖、D-松二糖和葡萄糖酸(盐)作为碳源。

[0024] 用于鉴定和分类根据本发明的青春双歧杆菌NK98的16S rDNA序列与本说明书所附的SEQ ID NO:38相同。因此,根据本发明的青春双歧杆菌NK98可以包括SEQ ID NO:38的16S rDNA。作为分析所述SEQ ID NO:38的16S rDNA序列的结果,该序列与已知的青春双歧杆菌菌株的序列具有98%的同源性,因此显示出与青春双歧杆菌的最高分子系统发育关系。因此,所述乳酸菌被鉴定为青春双歧杆菌,称为青春双歧杆菌NK98,并于2018年8月3日保藏于KCCM(保藏号:KCCM12297P)。

[0025] 可以根据本领域中的常规方法来分析根据本发明的青春双歧杆菌NK98的生理特性,其中其结果如下表4所示。特别地,青春双歧杆菌NK98可以使用D-葡萄糖、D-甘露醇、D-乳糖、D-蔗糖、D-麦芽糖、水杨苷、D-木糖、L-阿拉伯糖、明胶、七叶灵柠檬酸铁、D-纤维二糖、D-棉子糖和D-海藻糖用作碳源。

[0026] 在实现所述目的的另一方面,本发明提供用于预防或治疗神经性精神疾病的药物组合物,其包含新型乳酸菌。

[0027] 在本发明中,所述新型乳酸菌可以是罗伊氏乳酸杆菌NK33,青春双歧杆菌NK98或其混合物。

[0028] 根据本发明的“罗伊氏乳酸杆菌NK33”和“青春双歧杆菌NK98”与上述相同。

[0029] 特别地,包含在根据本发明的药物组合物中的乳酸菌可以是其活细菌细胞、其死细菌细胞、其培养产物、其破碎物或其提取物,但是可以不受限制地使用任何类型的乳酸菌,只要它可以对神经性精神疾病达到预防或治疗作用即可。

[0030] 在本发明中,术语“培养产物”是指通过在已知的液体培养基或固体培养基中培养乳酸菌而获得的对象,并且是涵盖本发明中新型乳酸菌的概念。

[0031] 根据本发明的神经性精神疾病可以是神经退行性疾病或精神疾病。

[0032] 特别地,根据本发明的神经性精神疾病可以是精神疾病,并且所述精神疾病可以选自焦虑、抑郁、情绪障碍、失眠、妄想障碍、强迫症、偏头痛、应激、记忆障碍、认知障碍和注意力障碍中的一种或多种。

[0033] 在根据本发明的示例性实施方式中,确定当将罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98施用于具有应激诱导的动物模型时,由应激引起的焦虑和抑郁行为被显著降低;具有应激诱导的动物模型的海马中NF- κ B的活性被抑制;脑源性神经营养因子的表达增加;血液中的应激参数皮质脂酮、IL-6、TNF- α 和脂多糖(LPS)的量降低。从该结果还发现包含所述乳酸菌的药物组合物可有助于预防或治疗神经性精神疾病,特别是精神疾病。

[0034] 特别地,根据本发明的神经性精神疾病可以是神经退行性疾病,其中所述神经退行性疾病可以选自帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓小脑萎缩、图雷特氏综合症、弗里德里希共济失调、马查多-约瑟夫病、痴呆、肌张力障碍、进行性核上性麻痹和额颞叶痴呆中的一种或多种。

[0035] 在根据本发明的示例性实施方式中,确定当用所述乳酸菌和应激激素皮质脂酮处理神经细胞时,被称为诱导神经退行性疾病例如阿尔茨海默氏病的物质的NF- κ B的活性被抑制,并且已知在衰老、痴呆等中减少的脑源性神经营养因子(BDNF)的表达同时增加(表5和6)。从该结果还确定了包含所述乳酸菌的药物组合物可有助于预防和治疗神经性精神疾病,特别是神经退行性疾病。

[0036] 此外,在根据本发明的示例性实施方式中,确定当与罗伊氏乳酸杆菌NK33和青春双歧杆菌NK98共同施用,与单独施用所述乳酸菌的各组相比,改善神经性精神疾病的效果,特别是减轻压力的效果被显著提高(表20)。

[0037] 在本发明中,所述药物组合物可以进一步包含青春双歧杆菌IM38 KCCM11807P。

[0038] 所述青春双歧杆菌IM38 KCCM11807P是在韩国专利公开号10-2017-0090359中公开的已知乳酸细菌,并且可以基于韩国专利公开号10-2017-0090359容易地获得。

[0039] 在根据本发明的示例性实施方式中,确定当将罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98和青春双歧杆菌IM38共同施用给具有应激诱导的动物模型时,由应激引起的焦虑和抑郁行为显著降低,并且血液中压力参数皮质脂酮的量减少了。

[0040] 在用于实现所述目的的另一方面,本发明提供用于预防或治疗炎症性疾病的药物组合物,其包含罗伊氏乳酸杆菌NK33,青春双歧杆菌NK98或其混合物。

[0041] 根据本发明的“罗伊氏乳酸杆菌NK33”和“青春双歧杆菌NK98”与上述相同。

[0042] 特别地,包含在根据本发明的药物组合物中的乳酸菌可以是其活细菌细胞、其死细菌细胞、其培养产物、其破碎物或其提取物,但是任何类型的乳酸细菌可以不受限制地使用,只要它可以对炎症性疾病实现预防或治疗作用。

[0043] 在本发明中,术语“培养产物”是指通过在已知的液体培养基或固体培养基中培养乳酸菌而获得的对象,并且是涵盖本发明中新型乳酸菌的概念。

[0044] 根据本发明的炎性疾病可以是选自关节炎、痛风、肝炎、哮喘、肥胖症、角膜炎、胃炎、肠炎、肾炎、结肠炎、糖尿病、结核、支气管炎、胸膜炎、腹膜炎、脊椎炎、胰腺炎、炎性疼痛、尿道炎、膀胱炎、阴道炎、动脉硬化、败血病、烧伤、皮炎、牙周炎和牙龈炎中的一种或多种。

[0045] 在根据本发明的示范性实施方式中,确定当用所述乳酸菌连同脂多糖(LPS),一种炎症反应诱导剂处理从小鼠分离的巨噬细胞时,炎症反应被显著抑制(表5和表6)。从结果中还确定了包含根据本发明的所述乳酸菌的药物组合物可有助于预防和治疗炎性疾病。

[0046] 特别地,炎性疾病可以是结肠炎。

[0047] 在根据本发明的示范性实施方式中,确定当将罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98施用于患有由应激诱导的结肠炎的动物模型时,作为结肠炎指示剂的结肠长度恢复为正常水平,结肠炎参数髓过氧化物酶,COX-2和iNOS的量均降低,TNF- α 的活性也降低(图15和表15)。从该结果还发现,包含所述罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98的药物组合物可有助于预防和治疗炎性疾病,特别是结肠炎。

[0048] 根据本发明的用于预防或治疗神经性精神疾病的药物组合物或用于预防或治疗炎性疾病的药物组合物可以通过本领域公知的方法制备成药物剂型,使得在给予哺乳动物后,可以通过快速、悬浮或延长释放来提供这种组合物的活性成分。在制备剂型中,根据本发明的药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体,其程度是这种载体不抑制新型乳酸菌的活性。

[0049] 药学上可接受的载体可以包括但不限于常规使用的载体,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、赤藓醇、麦芽糖醇、淀粉、金合欢胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石粉、硬脂酸镁、矿物油等。此外,根据本发明的药物组合物可以包含稀释剂或赋形剂,例如填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、表面活性剂等,以及其他药学上可接受的添加剂。

[0050] 根据本发明的药物组合物的剂量需要为药学有效量。“药学有效量”是指足以以适用于医学治疗的合理的利益/风险比预防或治疗神经性精神疾病或炎性疾病的量。有效剂量水平可以由本领域技术人员根据诸如配制方法、患者的病况和体重、患者的性别、年龄和疾病程度、药物形式、给药途径和时间、排泄率,反应敏感性等这些因素进行多种选择。如本领域技术人员所认识的,有效量可以根据治疗途径、赋形剂的使用以及与其他药物一起使用的可能性而变化。但是,在施用口服制剂达到较好效果的情况下,根据本发明的组合物通常可以基于每公斤体重以每天0.0001至100mg/kg,优选0.001至100mg/kg的量向成年人给药。当如上所述施用这种制剂时,根据本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98可以每天 1×10^2 CFU/60kg至 1×10^{11} CFU/60kg的量给药。这种给药可以一天一次,也可以一天几次。所述剂量在任何方面均不限制根据本发明的范围。

[0051] 根据本发明的用于预防或治疗神经性精神疾病的药物组合物或用于预防或治疗炎性疾病的药物组合物可以通过各种途径施用于哺乳动物,例如小鼠,牲畜,人等。特别地,根据本发明的药物组合物可以口服或肠胃外给药(例如静脉内,皮下或腹膜内给药或注

射),但是优选口服给药。用于口服的固体制剂可以包括粉剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、软胶囊剂、丸剂等。除常用的简单稀释剂水和液体石蜡以外,用于口服的液体制剂可以包括悬浮剂、内部使用的液体剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂等,但是它们还可以包括各种赋形剂,例如保湿剂、甜味剂、调味剂、防腐剂等。用于肠胃外给药的制剂可以根据各自的常规方法通过配制成外用制剂和无菌注射制剂的剂型来使用,例如无菌水溶液、液体、非水溶剂、悬浮剂、乳剂、滴眼剂、眼药膏、糖浆剂、栓剂、气雾剂等,并且优选地可以通过制备乳膏、凝胶、贴剂、喷雾剂、软膏、膏药、洗剂、擦剂、眼药膏、滴眼剂、糊剂或泥罨剂的药物组合物来使用,但是不限于此。取决于临床处方,用于局部给药的制剂可以是无水或水性形式。作为上述非水溶剂和悬浮剂,可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油,可注射酯如油酸乙酯等。作为上述栓剂的基质,可以使用维比索尔(Witepsol),聚乙二醇,吐温61,可可脂,月桂油,甘油明胶等。

[0052] 在实现所述目的的另一方面,本发明提供预防或治疗神经性精神疾病的方法,该方法包括将罗伊氏乳酸杆菌NK33、青春双歧杆菌NK98或其混合物施用于个体的步骤。

[0053] 在实现所述目的的另一方面,本发明提供预防或治疗炎性疾病的方法,其包括将罗伊氏乳酸杆菌NK33,青春双歧杆菌NK98或其混合物施用于个体的步骤。

[0054] 根据本发明的术语“罗伊氏乳酸杆菌NK33”、“青春双歧杆菌NK98”、“给药”、“神经性精神疾病”、“炎性疾病”等与上述相同。

[0055] 个体是指动物,并且通常可以是哺乳动物,使用根据本发明的新型乳酸细菌进行的治疗可能显示出有益效果。这种个体的优选实例可以包括诸如人类的灵长类动物,以及大鼠、小鼠、猴子、狗、猫、牛、马、猪、绵羊或山羊。而且,这样的个体可以包括具有神经性精神疾病或炎症疾病的症状或具有患这种症状的风险的所有个体。

[0056] 在用于实现所述目的的另一方面,本发明提供用于预防或改善神经性精神疾病的保健功能食品,其包含罗伊氏乳酸杆菌NK33,青春双歧杆菌NK98或其混合物。

[0057] 在用于实现所述目的的另一方面,本发明提供用于预防或改善炎症疾病的保健功能食品,其包含罗伊氏乳酸杆菌NK33,青春双歧杆菌NK98或其混合物。

[0058] 根据本发明的术语“罗伊氏乳酸杆菌NK33”、“青春双歧杆菌NK98”、“给药”、“神经性精神疾病”、“炎性疾病”等与上述相同。

[0059] 强调食品的身体调节功能的保健功能食品是通过物理、生化或生物工程方法赋予附加值的食品,以使食品可以发挥其用于特定目的的功能。设计和加工这种保健功能食品的成分,以在体内充分发挥其身体调节功能,这涉及保卫活体、调节身体节律、预防疾病和帮助疾病康复,并且可以包含食品可接受的食物补充添加剂,甜味剂或功能性原料。

[0060] 在使用根据本发明的罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98作为保健功能食品(或保健功能饮料添加剂)的情况下,可以将所述乳酸菌按原样添加到其中,与其他食品或食物成分一起使用,或根据常规方法适当使用。所述乳酸菌的混合量可以根据其使用目的(预防、健康、改善或治疗)适当地确定。

[0061] 保健功能食品可包含各种营养素、维生素、矿物质(电解质)、调味剂(例如合成调味剂、天然调味剂等)、着色剂和增强剂(奶酪、巧克力等)、果胶酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、碳酸饮料中使用的碳酸化器等。而且,根据本发明的保健功能食品可包含用于制备果蔬饮料的浆液。这些组分可以单独使用或组合使

用,并且相对于组合物的总重量,此类添加剂的比例通常选自0.001至50重量份。

[0062] 保健功能食品的类型没有特别限制。作为可以添加上述乳酸菌的食品,有香肠、肉类、面包、巧克力、零食、糖果、糕点、拉面、比萨、其他面条、口香糖、乳制品(包括冰淇淋),各种汤、饮料、茶、保健饮料、酒精饮料、维生素复合物等。在被配制成饮料的情况下,除了新颖的乳酸菌外,添加到饮料中的液体成分可以包括但不限于各种调味剂、天然碳水化合物等作为附加成分,就像常规饮料中所含的一样。前述天然碳水化合物可以是单糖(例如葡萄糖、果糖等)、二糖(例如麦芽糖、蔗糖等)和多糖(例如常规糖如糊精、环糊精等)以及糖醇,如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇等。

[0063] 在用于实现所述目的的另一方面,本发明提供用于诊断神经性精神疾病的组合物,其包括用于测量肠道微生物水平的制剂。

[0064] 根据本发明的诸如“神经性精神疾病”等术语与上述相同。

[0065] 在本发明中,术语“肠道微生物”是指存在于消化道中的微生物,特别是肠中特异性存在的微生物,其中这种肠道微生物可以是选自拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌、乳酸杆菌、 β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌中的一种或多种。

[0066] 特别地,如果在所述肠道微生物中 β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌中一种或多种的水平增加,根据本发明的用于诊断的组合物可以诊断神经性精神疾病;如果在所述肠道微生物中拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌、乳酸杆菌中一种的水平降低,则该组合物可以诊断神经性精神疾病;和如果在所述肠道微生物中 β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌中一种或多种的水平增加,和如果在所述肠道微生物中拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌、乳酸杆菌中一种的水平降低,则该组合物可以诊断神经性精神疾病。

[0067] 特别地,水平增加的所述肠杆菌,其可以选自产酸克雷伯氏菌,大肠杆菌和摩氏摩根菌中的一种或多种。

[0068] 此外,水平降低的所述乳酸杆菌可以选自罗伊氏乳酸杆菌,约氏乳酸杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)和鼠李糖乳酸杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)中的一种或多种,并且水平降低的所述双歧杆菌可以是动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)。

[0069] 本发明提供的用于诊断神经性精神疾病的组合物,其包含能够测量肠道微生物水平的制剂,其中可以借助于包含在组合物中的制剂,通过测量分离自需要确定神经性精神疾病的发生的个体的粪便中肠道微生物水平,来鉴定对个体的神经性精神疾病的发生。所述个体可以是动物,优选地是哺乳动物,例如像人的灵长类动物,以及大鼠、小鼠、猴子、狗、猫、牛、马、猪、绵羊或山羊。

[0070] 所述制剂可以用于通过测量从所述个体的粪便中分离出的肠道微生物的水平,鉴定所述个体是否发生了神经性精神疾病。

[0071] 能够测量所述肠道微生物的水平的制剂可以特别是能够测量肠道微生物的特定基因的水平引物或探针等;可以是能够测量从所述特定基因表达的蛋白质的水平的抗体或适配体等;可以是定量分析肠道微生物的16S rDNA序列的引物或探针等;并且可以是用于焦磷酸测序等以定量分析肠道微生物的基因组DNA序列的制剂,但不特别限于此,只要该制剂可以用于定量分析从个体粪便分离的肠道微生物即可。

[0072] 特别地,对厚壁菌,所述肠道微生物特异的引物可以由SEQ ID NO:2和SEQ ID

NO:3组成的引物对;对拟杆菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5组成的引物对;对 β -变形菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7组成的引物对;对 δ/γ -变形菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9组成的引物对;对 ϵ -变形菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11组成的引物对;对放线菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13组成的引物对;和对肠杆菌特异的引物可以是由SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19组成的引物对。

[0073] 在根据本发明的示例性实施方式中,采用包含表1中SEQ ID NO:2至SEQ ID NO:19的条形码引物(barcode primer)的焦磷酸测序试剂,通过实施焦磷酸测序来测量肠道微生物水平(实验实施例3)。

[0074] 根据本发明的组合物可以进一步包含用于测量脂多糖(LPS)的量的试剂。特别地,用于测量所述脂多糖(LPS)的量的试剂可以是常规用于测量脂多糖(LPS)的量的试剂,更具体地包括在鲎试剂(LAL)检测试剂盒中的试剂,但不限于此。

[0075] 在根据本发明的示例性实施方式中,分析患有诱发的精神疾病的动物模型的粪便,确定脂多糖(LPS)的量增加(图1、2、7和11)。

[0076] 在另一方面,本发明提供用于诊断神经性精神疾病的试剂盒,其包含所述组合物。

[0077] 根据本发明的试剂盒可以包括收集容器,该收集容器能够收集待通过使用所述组合物鉴定神经性精神疾病的发生的个体的粪便;用于提取粪便中的肠道微生物的缓冲溶液;用于测量肠道微生物的测量装置,等等。

[0078] 在另一方面,本发明提供用于诊断神经性精神疾病的方法,该方法包括:测量分离自疑似患有神经性精神疾病的个体的粪便中肠道微生物水平的步骤;比较所述肠道微生物水平与对照组粪便中肠道微生物水平而不是神经性精神疾病的水平的步骤。

[0079] 另外,本发明提供用于诊断神经性精神疾病的信息提供方法,该方法包括:测量分离自疑似患有神经性精神疾病的个体的粪便中肠道微生物水平的步骤;比较所述肠道微生物水平与对照组粪便中肠道微生物水平而不是神经性精神疾病的水平的步骤。

[0080] 粪便是指从个体分离并收集的粪便,作为用于测量肠道微生物水平的样品。

[0081] 特别地,肠道微生物可以选自拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌、乳酸杆菌、 β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌中的一种或多种。

[0082] 根据本发明的用于诊断神经性精神疾病或基于其提供信息的方法可以通过在所述肠道微生物中鉴定水平升高的微生物来诊断神经性精神疾病是否发生或具有发生的风险。

[0083] 特别地,用于诊断神经性精神疾病或基于其提供信息的方法可以进一步包括以下步骤:通过比较疑似患有神经性精神疾病的个体粪便中肠道微生物的水平 and 对照组粪便中肠道微生物的水平,而不是神经性精神疾病的水平,将肠道微生物水平升高的个体确定为神经性精神疾病。

[0084] 水平升高的肠道微生物可以选自 β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌中的一种或多种。

[0085] 特别地,肠杆菌可以选自产酸克雷伯菌、大肠杆菌和摩氏摩根菌中的一种或多种。

[0086] 另外,根据本发明的用于诊断神经性精神疾病或基于其提供信息的方法可以通过鉴定在所述肠道微生物中水平降低的微生物来诊断神经性精神疾病是否发生或具有发生

的风险。

[0087] 根据本发明的诸如“神经性精神疾病”等术语与上述相同。

[0088] 特别地,用于诊断神经性精神疾病或基于其提供信息的方法可以进一步包括以下步骤:通过比较疑似患有神经性精神疾病的个体粪便中肠道微生物的水平 and 对照组粪便中肠道微生物的水平,而不是神经性精神疾病的水平,将肠道微生物水平降低的个体确定为神经性精神疾病。

[0089] 水平降低的肠道微生物可以选自拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌和乳酸杆菌中的一种或多种。

[0090] 另外,乳酸杆菌可以选自罗伊氏乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌和鼠李糖乳酸杆菌中的一种或多种,并且双歧杆菌可以是动物双歧杆菌。

[0091] 在根据本发明的示例性实施方式中,作为通过使用从具有诱发的应激,例如束缚应激,抗生素应激等的动物模型分离的粪便鉴定肠道微生物群落变化的结果,确定与没有应激的动物模型相比, β -变形菌、 δ -变形菌、 γ -变形菌、 ϵ -变形菌和肠杆菌水平增加,而拟杆菌、放线菌、厚壁菌、双歧杆菌和乳酸杆菌的水平降低(图2、6、8、10和12)。特别地,确定水平升高的特定肠杆菌,有产酸克雷伯菌、大肠杆菌和摩氏摩根菌;水平降低的特定乳酸杆菌,有罗伊氏乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌和鼠李糖乳酸杆菌;水平降低的特定的双歧杆菌,有动物双歧杆菌。

[0092] 在另一方面,本发明提供新型乳酸菌在预防或治疗神经性精神疾病中的用途。特别地,本发明提供罗伊氏乳酸杆菌NK33在预防或治疗神经性精神疾病中的用途。另外,本发明提供青春双歧杆菌NK98在预防或治疗神经性精神疾病中的用途。

[0093] 在另一方面,本发明提供新型乳酸菌在预防或治疗炎性疾病中的用途。特别地,本发明提供罗伊氏乳酸杆菌NK33在预防或治疗炎性疾病中的用途。另外,本发明提供青春双歧杆菌NK98在预防或治疗炎性疾病中的用途。

[0094] 在另一方面,本发明提供包含新型乳酸菌的组合物在制备用于预防或治疗神经性精神疾病的药物中的用途。特别地,本发明提供包含罗伊氏乳酸杆菌NK33的组合物在制备用于预防或治疗神经性精神疾病的药物中的用途。另外,本发明提供包含青春双歧杆菌NK98的组合物在制备用于预防或治疗神经性精神疾病的药物中的用途。

[0095] 根据本发明的术语“罗伊氏乳酸杆菌NK33”、“青春双歧杆菌NK98”、“神经性精神疾病”、“炎性疾病”等与上述相同。

[0096] 除非另有说明,否则本说明书中描述的数值应解释为包括其等效范围。

[0097] 在下文中,将通过优选的实施例详细描述本发明,以更好地理解本发明。然而,仅出于说明根据本发明的目的提供以下实施例,因此本发明不限于此。

[0098] 有利效果

[0099] 根据本发明的新型乳酸菌,即罗伊氏乳酸杆菌NK33或青春双歧杆菌NK98具有抑制神经退行性疾病诱导因子并减少焦虑和抑郁行为的作用。因此,根据本发明的新型乳酸菌可以用作预防或治疗神经性精神疾病的组合物,并且在预防和治疗神经退行性疾病和精神疾病方面特别有效。

[0100] 另外,根据本发明的新型乳酸菌有效抑制炎症反应,因此可以用于预防或治疗炎性疾病的组合物中,特别是在预防和治疗结肠炎中有效。

[0101] 此外,根据本发明的用于测量肠道微生物水平的组合物可通过测量肠道微生物水平来有效诊断神经性精神疾病。

[0102] 附图简要说明

[0103] 图1是受束缚应激的小鼠 (IS) 的焦虑行为和血液指标的测定结果;(a) 是确认高架十字迷宫测试结果的开放臂滞留时间 (OT) 和开放臂进入次数 (OE) 减少的图;(b) 是确认亮/暗转换测试结果的明区时间减少的图;(c) 是确认玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加的图;(d) 是确认海马中NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加并且脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达水平降低的图;(e) 是确认血液中皮质脂酮增加的图;(f) 是确认血液中IL-6增加的图;(g) 是确认血液中的TNF- α 升高的图;和 (h) 是确认血液中的脂多糖 (LPS) 增加的图。

[0104] 图2 (a) 是确认受束缚应激的小鼠 (IS) 的粪便中肠道微生物群落变化的图;和图2 (b) 是确认束缚应激的小鼠 (IS) 的粪便中脂多糖 (LPS) 增加的图。

[0105] 图3示出受束缚应激的小鼠 (IS) 结肠炎指标的测定结果;(a) 是确认受束缚应激的小鼠 (IS) 的结肠长度减少的图;(b) 是确认结肠中髓过氧化物酶增加的图;(c) 是确认结肠中TNF- α 增加的图;(d) 是确认结肠中COX-2和iNOS的表达增加并且NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加的图;(e) 是确认结肠中闭合蛋白 (occludin) 和密封蛋白-1 (claudin-1) 减少的图。

[0106] 图4示出确认施用诱导束缚应激的动物模型的粪便的动物模型 (FIS) 的状态的结果;(a) 是确认高架十字迷宫测试结果的开放臂滞留时间 (OT) 和开放臂进入次数 (OE) 减少的图;(b) 是确认亮/暗转换测试结果的明区时间减少的图;(c) 是确认玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加的图;(d) 是确认海马中NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加并且脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达水平降低的图;(e) 是确认结肠长度减少的图;和 (f) 是确认结肠中髓过氧化物酶增加的图。

[0107] 图5示出施用诱导束缚应激的动物模型的粪便的动物模型 (FIS) 的血液指标的测量结果;(a) 是确认血液中皮质脂酮增加的图;(b) 是确认血液中IL-6增加的图;和 (c) 是确认血液中TNF- α 升高的图。

[0108] 图6示出确认施用诱导束缚应激的动物模型的粪便的动物模型 (FIS) 的结肠炎指标和肠道微生物群落的变化结果;(a) 是确认TNF- α 增加的图;(b) 是确认结肠中IL-6增加的图;(c) 是确认结肠中IL-10减少的图;(d) 是确认结肠中COX-2和iNOS的表达增加并且NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加的图;和 (e) 是确认粪便中的肠道微生物群落改变的图。

[0109] 图7示出受抗生素应激的小鼠 (AP) 的焦虑行为和血液指标的测定结果图;(a) 是确认高架十字迷宫测试结果的开放臂滞留时间 (OT) 和开放臂进入次数 (OE) 减少的图;(b) 是确认亮/暗转换测试结果的明区时间减少的图;(c) 是确认玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加的图;(d) 是确认海马中NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加并且脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达水平降低的图;(e) 是确定血液中皮质脂酮增加的图;(f) 是确认血液中IL-6增加的图;(g) 是确认血液中TNF- α 升高的图;和 (h) 是确定血液中脂多糖 (LPS) 增加的图。

[0110] 图8 (a) 是确认受抗生素应激的小鼠 (AP) 的粪便中肠道微生物群落发生变化的图;和图8 (b) 是确认受抗生素应激的小鼠 (AP) 的粪便中脂多糖 (LPS) 增加的图。

[0111] 图9示出受抗生素应激的小鼠 (AP) 结肠炎指标的测定结果;(a) 是确认结肠长度减少的图;(b) 是确认结肠中髓过氧化物酶增加的图;(c) 是确认结肠中TNF- α 增加的图;(d) 是确认结肠中COX-2和iNOS的表达增加并且NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加的图;和 (e) 是确认结

肠中闭合蛋白和密封蛋白-1减少的图。

[0112] 图10(A)是确认在选择培养基中培养受束缚应激的小鼠(IS)的粪便和受抗生素应激的小鼠(AP)的粪便后细菌增加的图;图10(B)是确认在选择培养基中培养受束缚应激的小鼠(IS)的粪便和受抗生素应激的小鼠(AP)的粪便后细菌减少的图。

[0113] 图11示出受束缚应激和抗生素应激的小鼠的粪便中微生物增加的小鼠(AP)的焦虑行为和血液指数的检测结果;(a)是作为施用产酸克雷伯菌(KO)、大肠杆菌(EC)、脲气球菌(*Aerococcus urinae*,AU)和摩氏摩根菌(MM)小鼠的高架十字迷宫测试结果,确认施用产酸克雷伯菌组中开放臂滞留时间(OT)和开放臂进入次数(OE)显著减少的图;(b)是作为施用产酸克雷伯菌(KO)小鼠的高架十字迷宫测试结果,确定开放臂滞留时间(OT)和开放臂进入次数(OE)减少的图;(c)是确认亮/暗转换测试结果的明区时间减少的图;(d)是确认玻璃珠埋埋试验中玻璃珠埋行为增加的图;(e)是确认海马中NF- κ B活性(p-p65/p65)增加并且脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低的图;(f)是确认血液中皮质脂酮增加的图;(g)是确认血液中IL-6增加的图;(h)是确认血液中的TNF- α 升高的图;和(i)是确认血液中的脂多糖(LPS)增加的图。

[0114] 图12(a)是确认施用产酸克雷伯菌的小鼠(KO)的粪便中肠道微生物群落变化的图;和图12(b)是确认施用产酸克雷伯菌的小鼠(KO)的粪便中脂多糖(LPS)增加的图。

[0115] 图13示出施用产酸克雷伯菌的小鼠(KO)的结肠炎指标的测定结果;(a)是确认结肠长度减少的图;(b)是确认结肠中髓过氧化物酶增加的图;(c)是确认结肠中TNF- α 增加的图;(d)是确认结肠中COX-2和iNOS的表达增加并且NF- κ B活性(p-p65/p65)增加的图;和(e)是确认结肠中闭合蛋白和密封蛋白-1减少的图。

[0116] 图14示出在对受束缚应激的小鼠施用生理盐水溶液的组(IS)和施用新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33的组(IS+LR)之间焦虑行为测量和血液指数比较结果;(a)是作为施用新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33的组(IS+LR)的高架十字迷宫测试结果,确认开放臂滞留时间(OT)和开放臂进入次数(OE)增加的图;(b)是确认亮/暗转换测试结果明区时间增加的图;(c)是确认玻璃珠埋埋试验中玻璃珠埋行为减少的图;(d)是确认海马中NF- κ B活性(p-p65/p65)被抑制并且脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平增加的图;(e)是确认血液中皮质脂酮减少的图;(f)是确认血液中IL-6减少的图;和(g)是确认血液中的TNF- α 减少的图。

[0117] 图15示出对受束缚应激的小鼠施用生理盐水溶液的组(IS)和施用新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33的组(IS+LR)的结肠炎指标的测量结果;(a)是确认出结肠长度已恢复的图;(b)是确认结肠中髓过氧化物酶减少的图;(c)是确认结肠中TNF- α 降低的图;(d)是确认结肠中COX-2和iNOS的表达降低和NF- κ B活性(p-p65/p65)降低的图。

[0118] 发明实施方式

[0119] 在下文中,将通过优选的实施例和实验实施例详细描述本发明,以更好地理解本发明。但是,仅出于说明本发明的目的而提供以下实施例和实验实施例,因此本发明不限于此。

[0120] 实验实施例1.具有诱发的精神疾病的动物模型

[0121] (1) 束缚应激

[0122] 为了诱发诸如焦虑、抑郁、应激之类的精神疾病,将小鼠固定到3×10cm的圆柱形

束缚应激设备上,使得小鼠不能在其中移动。

[0123] 特别地,为了制备具有束缚应激引起的焦虑的小鼠,将已经固定在设备上的所述小鼠反复经受束缚应激五次,以使小鼠保持抬头姿势,每隔一天进行两个小时,然后在最终的束缚应激后两个小时内进行行为实验。

[0124] 同样,为了制备具有由束缚应激引起的抑郁症的小鼠,将已经固定在设备上的所述小鼠每天一次连续地经受连续束缚应激两天,以这样的方式使小鼠保持抬头姿势,进行12个小时。乳酸菌每天给药一次,持续五天,最后一次给药后一小时内进行行为实验。

[0125] (2) 抗生素应激

[0126] 为了诱发诸如焦虑、抑郁、应激之类的精神疾病,连续两天给小鼠施用氨苄青霉素(100mg/kg)。给药后10天内测量焦虑行为。

[0127] (3) 对有诱发精神疾病的动物模型的实验方法

[0128] 对于诱发束缚应激的小鼠模型,从束缚应激开始后的第7天起,根据实验分组,每天一次给予乳酸菌或生理盐水溶液,进行三天。对于诱发抗生素应激的小鼠模型,从抗生素应激开始后的第7天起,根据实验分组,每天一次给予乳酸菌或生理盐水溶液,进行三天。

[0129] 给予乳酸菌或生理盐水溶液后五小时内测量焦虑行为,并在完成高架十字迷宫测试后一小时内采集血液来测量血液指标(皮质脂酮、IL-6、TNF- α 等)。

[0130] 实验实施例2. 用于应激诊断的行为测量方法

[0131] (1) 高架十字迷宫(EPM)测试

[0132] 高架十字迷宫是用于测量诸如应激、焦虑之类的精神疾病程度的实验设备。本实验中使用的EPM实验设备是黑色有机玻璃设备,其中两个开放臂(30x 7厘米)和两个封闭臂(30x 7厘米),壁高20厘米,竖立在底板上方50厘米高,每个距离中心平台延伸7厘米。在本测试中,将小鼠放在房间的高架十字迷宫中,在那里将20勒克斯的摄像机安装在高处,然后记录小鼠的运动。

[0133] 特别地,将C57BL/6小鼠(雄性,19-22g)放置在高架十字迷宫的中间,以使小鼠的头朝向开放臂。测量开放和封闭臂滞留时间以及臂进入次数,五分钟。臂进入定义为小鼠四只脚进入臂的情况。

[0134] 在整个测试时间中,通过 $[\text{开放臂滞留时间(OT)} / (\text{开放臂滞留时间(OT)} + \text{封闭臂滞留时间})] \times 100$ 来计算总测试时间的开放臂滞留时间(OT)。通过 $[\text{开放臂进入(OE)} / (\text{开放臂进入(OE)} + \text{封闭臂进入})] \times 100$ 来计算开放臂进入(OE)。每个行为实验结束后,通过70%的乙醇消除残留气味。

[0135] 根据测试结果的已知解释,可以解释为如果OT和OE降低,则会出现诸如焦虑、抑郁之类的精神疾病症状。

[0136] (2) 明暗转换测试

[0137] 用于明/暗转换测试的设备由亮区(21x 42x 25cm,390Lux白色二极管)和暗区(21x 42x 25cm,2Lux)组成,其大小相同并用一扇门(7.5x 7.5厘米)隔开。将小鼠放在明亮的区域中并观察五分钟,在此期间,测量明区时间和进入明区的转换数。每次行为实验结束后,均用70%乙醇消除残留的气味。

[0138] 根据对测试结果的已知解释,可以解释为,如果明区时间和进入明区的转换数减少,则会出现诸如焦虑、抑郁等的精神疾病症状。

[0139] (3) 玻璃珠埋试验

[0140] 将小鼠放在装有5厘米深木屑的透明笼中,15分钟后,将25个玻璃珠(透明,直径2厘米)以5厘米的间隔放在深木屑上。再次将小鼠置于一侧的中间,并测量30分钟内小鼠埋入玻璃珠的数量。

[0141] 根据对测试结果的已知解释,可以解释为,如果小鼠掩埋和隐藏玻璃珠的行为增加,就会出现精神疾病症状,如焦虑,沮丧等。

[0142] (4) 强迫游泳测试 (FST)

[0143] 根据Porsolt等人 (Porsolt RD, Le Pichon, Jalfre M (1977) 抑郁症:对抗抑郁药敏感的新动物模型,自然,266卷;730-732页)的方法,将25±1℃的水填充到水箱(高度为40厘米,直径为20厘米),直到水位达到25厘米高。将实验小鼠放入每个槽中,并在该槽中停留总共六分钟,其中前两分钟未测量作为适应时间,然后在最后四分钟中,测量实验动物的静止时间。静止是指除了最小移动以保持仅其头部在水面之上外,小鼠不动地漂浮在水中的状态。

[0144] (5) 尾部悬挂测试 (TST)

[0145] 根据Steru等人 (Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) 尾部悬挂试验:一种筛选小鼠抗抑郁药的新方法,心理药理学“Psychopharmacology”,第85卷;第367-370页)的方法,将小鼠吊在容器(直径为35cm,高度为50cm)中,将固定装置放置在距鼠尾末端约1cm处,使小鼠悬于底部上方50cm处。测量实验动物的静止时间,共计六分钟。

[0146] 实验实施例3. 鉴定肠道微生物群落的实验

[0147] 进行实时PCR或454焦磷酸测序测量肠微生物群落中厚壁菌、变形菌、放线菌、拟杆菌等的份额。

[0148] 特别地,通过QIAamp DNA粪便微型试剂盒(凯杰,德国)分离从动物模型获得的粪便的DNA。通过条形码引物(细菌16S rDNA基因的V1至V3域)进行焦磷酸测序。通过下表1中所示的引物分析qPCR。

[0149] 表1

类型	序列 (5'-3')	
厚壁菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 2) GGA GYA TGT GGT TTA ATT CGA AGC A
	反向(R)	(SEQ ID NO: 3) AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC
拟杆菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 4) GTT TAA TTC GAT GAT ACG CGA G
	反向(R)	(SEQ ID NO: 5) TTA ASC CGA CAC CTC ACG G
β-变形菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 6) AAC GCG AAA AAC CTT ACC TAC C
	反向(R)	(SEQ ID NO: 7) TGC CCT TTC GTA GCA ACT AGT G

[0150]

δ/γ- 变形菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 8) GCT AAC GCA TTA AGT RYC CCG
	反向(R)	(SEQ ID NO: 9) GCC ATG CRG CAC CTG TCT
ε- 变形菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 10) TAG GCT TGA CAT TGA TAG AAT C
	反向(R)	(SEQ ID NO: 11) CTT ACG AAG GCA GTC TCC TTA
放线菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 12) TGT AGC GGT GGA ATG CGC
	反向(R)	(SEQ ID NO: 13) AAT TAA GCC ACA TGC TCC GCT
TM	正向(F)	(SEQ ID NO: 14) AYT GGG CGT AAA GAG TTG C
	反向(R)	(SEQ ID NO: 15) TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T
疣微菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 16) TCA KGT CAG TAT GGC CCT TAT
	反向(R)	(SEQ ID NO: 17) CAG TTT TYA GGA TTT CCT CCG CC
肠杆菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 18) CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C
	反向(R)	(SEQ ID NO: 19) CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC
大肠 杆菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 20) CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA
	反向(R)	(SEQ ID NO: 21) ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G
克雷 伯氏菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 22) GAT ACG GAG TAT GCC TTT ACG GTG
	反向(R)	(SEQ ID NO: 23) TAG CCT TTA TCA AGC GGA TAC TGG
产酸克 雷伯菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 24) GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA
	反向(R)	(SEQ ID NO: 25) ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT
摩氏 摩根菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 26) CTC GCA CCA TCA GAT GAA CCC ATA T
	反向(R)	(SEQ ID NO: 27) CAA AGC ATC TCT GCT AAG TTC TCT GGA TG
罗伊氏 乳酸杆 菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 28) GAA CGC AYT GGC CCA A
	反向(R)	(SEQ ID NO: 29) TCC ATT GTG GCC GAT CAG T
约氏 乳酸杆 菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 30) CAC TAG ACG CAT GTC TAG AG
	反向(R)	(SEQ ID NO: 31) AGT CTC TCA ACT CGG CTA TG
植物乳 酸杆菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 32) TCA TGA TTT ACA TTT GAG TG
	反向(R)	(SEQ ID NO: 33) GAC CAT GCG GTC CAA GTT GTT
鼠李糖 乳酸杆 菌	正向(F)	(SEQ ID NO: 34) CGC CCT TAA CAG CAG TCT TC
	反向(R)	(SEQ ID NO: 35) GCC CTC CGT ATG CTT AAA CC
细菌 16S rDNA	正向(F)	(SEQ ID NO: 36) TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTG CCA GCM GCC GCG GTA A
	反向(R)	(SEQ ID NO: 37) GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGG ACT ACH VGG GTW TCT AAT

[0152] 实验实施例4. 测量脂多糖的方法

[0153] (1) 测定粪便中脂多糖的方法

[0154] 将粪便(20mg)悬浮在30mL的PBS中,然后通过超声处理将其微生物破碎1小时,然后以500rpm离心15分钟。将所得的上清液用0.45μm的过滤器过滤,然后再次用0.22μm的过滤器过滤,随后在70℃下处理10分钟,接着作为样品使用。对于所述样品,通过鲎试剂(LAL)

测定试剂盒(美国马萨诸塞州东法尔茅斯科德角公司)测量脂多糖。

[0155] (2) 测定血液中脂多糖的方法

[0156] 用PBS将血液稀释10倍后离心,然后将所得的上清液在0℃下处理10分钟。将所得的上清液用0.45μm的过滤器过滤后再次用0.22μm的过滤器过滤,接着作为样品使用。对于所述样品,通过鲎试剂(LAL)测定试剂盒(美国马萨诸塞州东法尔茅斯科德角公司)测量脂多糖。

[0157] 实验实施例5. 结肠炎指标的测定方法

[0158] (1) 髓过氧化物酶活性的测定

[0159] 将200μl的含有0.5%的十六烷基三甲基溴化铵的pH 7.0的10mM磷酸钾缓冲液放入100mg的结肠组织中,然后进行均质化。将得到的混合物在4℃和10,000g的条件下离心10分钟,以获得上清液。将50μl上清液放入0.95ml反应溶液(含有1.6mM四甲基联苯胺和0.1mM H₂O₂)中,然后在37℃下进行反应,然后在650nm下显微镜观察。用所得反应物H₂O₂ 1μmol/ml = 1单位计算所述髓过氧化物酶(MPO)的活性。

[0160] (2) 炎性指标的测定

[0161] 通过蛋白质印迹法测量炎症反应生物标志物,例如p-p65、p65、iNOS、COX-2和β-肌动蛋白。特别地,取50μg的上清液,其通过与所述用于测量髓过氧化物酶(MPO)活性的实验相同的方法获得,然后对其进行免疫印迹。另外,通过ELISA试剂盒测定细胞因子的表达水平,通过LAL测定试剂盒测定LPS。

[0162] 实施例1: 鉴定具有诱发束缚应激的动物模型的状态

[0163] 根据实验实施例2至5,对小鼠(IS)实施试验,采用与实验实施例1-(1)相同的方法,每隔一天对小鼠进行共5次束缚应激。

[0164] 作为实施实验实施例2的结果,确认在高架十字迷宫测试中开放臂滞留时间(OT)和开放臂进入(OE)减少;在明暗转换测试中明区时间减少;并且玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加(图1(a)至(c))。

[0165] 另外,Western印迹进行鉴定的结果是,确认海马中的NF-κB活性(p-p65/p65)增加;脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低(图1(d));和血液中皮质脂酮、IL-6、TNF-α和脂多糖的量增加(图1(e)至(h))。

[0166] 作为实施实验实施例3的结果,确认粪便中的拟杆菌、放线菌和厚壁菌减少,并且δ, γ-变形菌和ε-变形菌增加。作为实施实验实施例4的结果,发现粪便中的脂多糖增加(图2)。

[0167] 作为实施实验实施例例5的结果,确认作为结肠炎的指标,结肠长度变短,髓过氧化物酶增加;结肠的TNF-α升高;结肠COX-2和iNOS的表达增加;NF-κB活性增加;以及闭合蛋白和密封蛋白-1,紧密连接蛋白减少(图3(a)至(e))。

[0168] 实施例2: 鉴定施用诱导束缚应激的动物模型的粪便的动物模型的状态

[0169] 根据实验实施例2至4,对小鼠(FIS)进行了实验,该小鼠被给予小鼠粪便,后者以上述实验实施例1-(1)中示出的相同方法,每隔一天进行共5次束缚应激。

[0170] 作为实施实验实施例2的结果,确认在高架十字迷宫试验中OT和OE降低;在明暗转换测试中明区时间减少;并且在玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加(图4(a)至(c))。

[0171] Western印迹进行鉴定的结果是,确认海马中的NF-κB活性(p-p65/p65)增加;脑源

性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低(图4(d));以及血液中皮质脂酮、IL-6和TNF- α 的含量增加(图5(a)至(c))。

[0172] 作为实施实验实施例5的结果,确认作为结肠炎的指标,结肠长度变短;髓过氧化物酶增加(图4(e)和(f));结肠的TNF- α 和IL-6增加;结肠的IL-10减少;结肠的COX-2和iNOS的表达增加;并且NF- κ B活性增加(图6(a)至(d))。

[0173] 作为实施实验实施例3的结果,确认粪便中的拟杆菌、放线菌和厚壁菌减少,并且 γ -变形菌和 ϵ -变形菌增加(图6(e))。

[0174] 实施例3:鉴定具有诱导的抗生素应激的动物模型的状态

[0175] 根据实验实施例2至5,对小鼠(AP)进行实验,以上述实验实施例1-(2)中示出的相同方法,连续两天氨苄西林(100mg/kg)给药使小鼠经受抗生素应激。

[0176] 作为实施实验实施例2的结果,确认在高架十字迷宫试验中OT和OE降低。在明暗转换测试中明区时间减少;并且在玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加(图7(a)至(c))。

[0177] 确认海马中的NF- κ B活性(p-p65/p65)增加;脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低(图7(d));以及血液中皮质脂酮、IL-6、TNF- α 和脂多糖的量增加(图7(e)至(h))。

[0178] 作为实施实验实施例3的结果,确认粪便中的拟杆菌、放线菌和厚壁菌减少,并且 δ 、 γ -变形菌和 ϵ -变形菌增加。作为进行实验实施例4的结果,确认粪便中的脂多糖增加(图8(a)和(b))。

[0179] 作为实施实验实施例5的结果,确认作为结肠炎的指标结肠长度变短;髓过氧化物酶增加;结肠的TNF- α 升高;结肠COX-2和iNOS的表达增加;NF- κ B活性增加;以及闭合蛋白和密封蛋白-1,紧密连接蛋白减少(图9(a)至(e))。

[0180] 实施例4:鉴定施用分离自诱导束缚应激的动物模型的粪便的微生物的动物模型的状态

[0181] (1)从诱导应激的动物模型的粪便中分离微生物

[0182] 在选择培养基中分别培养经受束缚应激的小鼠的粪便和经受抗生素应激的小鼠的粪便。结果,发现在DHL培养基中生长的肠杆菌增加,并且特别是产酸克雷伯菌、大肠杆菌和摩氏摩根菌增加(图10(A))。

[0183] 另一方面,确认在BL培养基中生长的双歧杆菌和乳酸杆菌减少,特别是罗伊氏乳酸杆菌、约氏乳酸杆菌、鼠李糖乳酸杆菌和动物双歧杆菌减少(图10(B))。

[0184] (2)鉴定施用微生物的动物模型的状态

[0185] 分别给每只小鼠施用 1×10^9 cfu的产酸克雷伯菌、大肠杆菌和摩氏摩根菌,它们在束缚应激小鼠和抗生素应激小鼠的粪便中均增加,根据以上实验实施例2-(1)进行高架十字迷宫试验。结果确定与施用其他微生物的组相比,施用产酸克雷伯菌的组中的OT和OE显著降低(图11(a))。

[0186] 之后,根据实验实施例2至5,对施用了产酸克雷伯菌的小鼠(KO)进行了实验。

[0187] 作为实施实验实施例2的结果,确认在高架十字迷宫试验中OT和OE降低;在明暗转换测试中明区时间减少;并且在玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加(图11(b)至(d))。

[0188] 确定海马中的NF- κ B活性(p-p65/p65)增加;脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低(图11(e));以及血液中皮质脂酮、IL-6、TNF- α 和脂多糖的量增加(图11(f)至(i))。

[0189] 作为实施实验实施例3的结果,发现粪便中的拟杆菌、放线菌和厚壁菌减少,粪便

中的 δ , γ -变形菌和 ϵ -变形菌增加。作为进行实验实施例4的结果,发现粪便中的脂多糖增加(图12(a)和(b))。

[0190] 作为实施实验实施例5的结果,确认作为结肠炎的指标,结肠长度变短;髓过氧化物酶增加;结肠的TNF- α 升高;结肠COX-2和iNOS的表达增加;NF- κ B活性增加;以及闭合蛋白和密封蛋白-1,紧密连接蛋白减少(图13(a)至(e))。

[0191] 实施例5:乳酸菌的分离和鉴定

[0192] (1) 从人和小鼠粪便中分离乳酸菌

[0193] 将新鲜的人粪便和小鼠粪便分别置入并悬浮在GAM液体培养基(GAM肉汤;日水制药,日本)中。之后,取上清液并植入MRS,BHI(脑心灌注)或BL琼脂培养基(日本日水制药),然后在37°C厌氧培养约48至72小时,然后分离形成菌落的菌株。

[0194] (2) 鉴定分离的乳酸菌

[0195] 分析从人或小鼠粪便中分离的菌株的生理特性和16S rDNA序列,然后鉴定菌株的种类,并给菌株命名。赋予乳酸菌的菌株名称如下表2所示。特别地,从人或小鼠的粪便分离出的乳酸菌是9种乳酸杆菌属和22种双歧杆菌属。

[0196] 表2

管理号	菌株名
1	罗伊氏乳酸杆菌NK31
2	罗伊氏乳酸杆菌NK32
3	罗伊氏乳酸杆菌NK33
4	罗伊氏乳酸杆菌NK34
[0197] 5	罗伊氏乳酸杆菌NK35
6	约氏乳酸杆菌NK36
7	约氏乳酸杆菌NK37
8	约氏乳酸杆菌NK38
9	约氏乳酸杆菌NK39
10	长双歧杆菌(<i>Bifidobacterium longum</i>) NK81

[0198]	11	长双歧杆菌NK82
	12	长双歧杆菌NK83
	13	长双歧杆菌NK84
	14	两歧双歧杆菌(<i>Bifidobacterium bifidum</i>)NK85
	15	两歧双歧杆菌NK86
	16	婴儿双歧杆菌(<i>Bifidobacterium infantis</i>)NK87
	17	婴儿双歧杆菌NK88
	18	婴儿双歧杆菌NK89
	19	短双歧杆菌(<i>Bifidobacterium breve</i>)NK90
	20	短双歧杆菌NK91
	21	小猪双歧杆菌(<i>Bifidobacterium choerinum</i>)NK92
	22	链状双歧杆菌(<i>Bifidobacterium catenulatum</i>)NK93
	23	链状双歧杆菌NK94
	24	青春双歧杆菌NK95
	25	假长双歧杆菌(<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>)NK96
	26	青春双歧杆菌NK97
	27	青春双歧杆菌NK98
	28	青春双歧杆菌NK99
	29	假链状双歧杆菌(<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>)NK100
	30	假链状双歧杆菌NK101
	31	最小双歧杆菌(<i>Bifidobacterium minimum</i>)NK102

[0199] (3) 新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33的生理特性

[0200] 在以上表2中描述的菌株中,鉴定出罗伊氏乳酸杆菌NK33(保藏号KCCM12090P)是革兰氏阳性杆菌。此外,还显示了罗伊氏乳酸杆菌NK33的16S rDNA具有SEQ ID NO:1的序列。通过BLAST搜索比较罗伊氏乳酸杆菌NK33的16S rDNA序列的结果,确认完全搜索不到具有完全相同16S rDNA序列的罗伊氏乳酸杆菌菌株,并且与已知的罗伊氏乳酸杆菌菌株的16S rDNA序列具有99%的同源性。

[0201] 使用API 50 CHL试剂盒(美国生物梅里埃公司)通过糖发酵试验分析罗伊氏乳酸杆菌NK33的生理特性中的碳源可用性。其结果如下表3所示。在下面的表3中,“+”表示碳源的可用性为正,而“-”表示碳源的可用性为负。

[0202] 表3

	碳源	罗伊氏乳酸杆菌NK33	碳源	罗伊氏乳酸杆菌NK33
[0203]	对照	-	七叶苷	+
	甘油	-	水杨苷	+
	赤藓糖醇	-	纤维二糖	+

[0204]	D-阿拉伯糖	-	麦芽糖	+
	L-阿拉伯糖	+	乳糖	+
	D-核糖	+	蜜二糖	+
	D-木糖	+	蔗糖	+
	L-木糖	-	海藻糖	+
	D-核糖醇	-	菊粉	-
	甲基-β-D-木吡喃糖苷	-	松三糖	+
	D-半乳糖	+	棉子糖	+
	D-葡萄糖	+	淀粉	-
	D-果糖	+	糖原	-
	D-甘露糖	+	木糖醇	-
	L-山梨糖	-	龙胆二糖	+
	鼠李糖	-	D-松二糖	+
	半乳糖醇	-	D-来苏糖	-
	肌醇	-	D-塔格糖	-
	甘露醇	+	D-海藻糖	-
	山梨醇	±	L-海藻糖	-
	α-甲基-D-甘露糖苷	-	D-阿拉伯醇	-
	α-甲基-D-葡萄糖苷	-	L-阿拉伯醇	-
	N-乙酰基-葡萄糖胺	+	葡糖酸盐	±
扁桃苷	+	2-酮-葡糖酸	-	
熊果苷	+	5-酮-葡糖酸	-	

[0205] (4) 新型乳酸菌青春双歧杆菌NK98的生理特性

[0206] 在以上表2中描述的菌株中,显示出青春双歧杆菌NK98的16S rDNA(保藏号KCCM12297P)具有SEQ ID NO:38的序列。通过BLAST搜索比较青春双歧杆菌NK98的16S rDNA序列,结果确认根本没有搜索到具有相同的16S rDNA序列的青春双歧杆菌NK98菌株,并且与已知的青春双歧杆菌菌株的16S rDNA序列具有98%的同源性。

[0207] 使用API 50 CHL试剂盒(API 20A,美国生物梅里埃公司)通过糖发酵试验分析青春双歧杆菌NK98的生理特性中的碳源可用性。其结果如下表4所示。在下面的表4中,“+”表示碳源的可用性为正,而“-”表示碳源的可用性为负。

[0208] 表4

碳源	反应/酶	青春双歧杆菌NK98
L-色氨酸	吡啉形成	-
尿素	脲酶	-
D-葡萄糖	酸化(葡萄糖)	+
D-甘露醇	酸化(甘露醇)	+

[0210]	D-乳糖	酸化 (乳糖)	+
	D-蔗糖	酸化 (蔗糖)	+
	D-麦芽糖	酸化 (麦芽糖)	+
	水杨苷	酸化 (水杨苷)	+
	D-木糖	酸化 (木糖)	±
	L-阿拉伯糖	酸化 (阿拉伯糖)	+
	明胶	水解 (蛋白酶)	+
	七叶苷柠檬酸铁	水解 (β -葡糖苷酶)	+
	甘油	酸化 (甘油)	-
	D-纤维二糖	酸化 (纤维二糖)	±
	D-甘露糖	酸化 (甘露糖)	-
	D-松三糖	酸化 (松三糖)	-
	D-棉子糖	酸化 (棉子糖)	+
	D-山梨醇	酸化 (山梨醇)	-
	L-鼠李糖	酸化 (鼠李糖)	-
	D-海藻糖	酸化 (海藻糖)	+
		过氧化氢酶	-
		孢子	-
		革兰氏反应	+
		形态学	-

[0211] 实施例7:分离的乳酸菌的活性比较

[0212] (1) 抗氧化活性 (体外)

[0213] 将DPPH (2,2-二苯基-1-三硝基苯肼) 溶解在乙醇中以达到0.2mM的浓度,从而制备DPPH溶液。将乳酸菌 (1×10^8 CFU/ml) 悬浮液或维生素C溶液 (1g/ml) 的置入0.1ml的所述DPPH溶液中,然后在37°C下培养20分钟。将培养液以3000rpm离心5分钟,从而获得上清液。之后,在517nm处测量上清液的吸光度,然后据此计算分离的乳酸菌的抗氧化活性。每种乳酸菌的抗氧化活性示于下表5 (乳酸杆菌属) 和表6 (双歧杆菌属)。

[0214] (2) 巨噬细胞炎症指标的测定

[0215] 将2ml无菌的4%巯基乙酸盐经腹膜内给药至C57BL/6小鼠 (雄性,6周龄,20-23g)。在96小时后,将小鼠麻醉,然后将8ml的RPMI 1640培养基腹膜内给予小鼠。在5至10分钟后,从小鼠腹膜内提取RPMI培养基 (巨噬细胞),然后以1000g离心10分钟,然后再次用RPMI 1640培养基洗涤两次。将所述巨噬细胞以每孔 0.5×10^6 个细胞铺展到24孔板中,然后用分离的乳酸杆菌属乳酸菌和脂多糖 (一种炎症反应诱导剂) 处理2或24小时,然后获得上清液和细胞。将获得的细胞置入RIPA缓冲液 (Gibco公司) 中并混匀。测量处理24小时的培养上清液中的细胞因子例如TNF- α 的表达水平,然后通过免疫印迹法测量处理两个小时获得的细胞的p65 (NF- κ B)、p-p65 (磷-NF- κ B) 和 β -肌动蛋白的表达水平。每个乳酸杆菌属乳酸菌的炎症指标的表达水平如下表5所示。

[0216] (3) 小神经胶质细胞炎症指标的测定

[0217] 以 0.5×10^6 个细胞/孔将BV-2小神经胶质细胞铺展到24孔板中,然后用分离的双歧杆菌属乳酸菌和脂多糖 (一种炎症反应诱导剂) 进行处理,持续2或24小时后获得上清液

和细胞。将获得的细胞置入RIPA缓冲液(Gibco公司)中并混匀。通过免疫印迹法测量处理2小时获得的细胞中的p65(NF-κB)、p-p65(磷-NF-κB)和β-肌动蛋白的表达水平。每个双歧杆菌属乳酸菌的炎症指标的表达水平如下表6所示。

[0218] (4) 脑源性神经营养因子(BDNF)表达和NF-κB活化对SH-SY5Y细胞的影响

[0219] 从大韩民国细胞株库购买SH-SY5Y细胞(神经细胞),然后在含有10%FBS和1%抗生素的DMEM培养基中培养,随后以每孔 2×10^6 个细胞的比例分至12孔板。之后,以300mg/ml的浓度将皮质脂酮与乳酸菌(1×10^4 CFU/ml)一起加入每个孔中,然后进行培养,之后采用免疫印迹法检测NF-κB(p65,p-p65)和脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平。每种乳酸菌的BDNF表达水平和NF-κB活化水平如下表5(乳酸杆菌属)和表6(双歧杆菌属)所示。

[0220] 表5

菌株名	抗氧化活性	巨噬细胞			SH-SY5Y细胞	
		TNF-α抑制能力	IL-10表达增加	NF-κB抑制能力	BDNF表达增加	NF-κB抑制
罗伊氏乳酸杆菌NK31	+	+	+	+	+	+
罗伊氏乳酸杆菌NK32	++	++	++	++	+	++
罗伊氏乳酸杆菌NK33	+++	++	++	++	++	++
罗伊氏乳酸杆菌NK34	+	+	+	+	+	+
罗伊氏乳酸杆菌NK35	+	+	+	+	+	+
约氏乳酸杆菌NK36	++	++	++	+	++	+
约氏乳酸杆菌NK37	++	++	++	++	+	++
约氏乳酸杆菌NK38	+	+	+	+	+	+
约氏乳酸杆菌NK39	+	+	+	+	-	+

[0222] 表6

菌株名	抗氧化活性	小神经胶质细胞NF-κB抑制能力	SH-SY5Y细胞BDNF表达能力
未处理的	-	-	-
罗伊氏乳酸杆菌NK33	+++	++	++
长双歧杆菌NK81	+	+	+
长双歧杆菌NK82	+	+	+
长双歧杆菌NK83	++	+	+
长双歧杆菌NK84	++	++	+
两歧双歧杆菌NK85	++	++	+
两歧双歧杆菌NK86	+	-	+
婴儿双歧杆菌NK87	++	+	+

	婴儿双歧杆菌NK88	+	+	++
	婴儿双歧杆菌NK89	+	+	+
	短双歧杆菌NK90	+	+	++
	短双歧杆菌NK91	++	+	+
	小猪双歧杆菌NK92	+	+	+
	链状双歧杆菌NK93	+	+	+
	链状双歧杆菌NK94	+	+	+
[0224]	青春双歧杆菌NK95	++	+	+
	假长双歧杆菌NK96	++	+	+
	青春双歧杆菌NK97	+	+	+
	青春双歧杆菌NK98	++	+++	+++
	青春双歧杆菌NK99	+	++	++
	假链状双歧杆菌NK100	++	+	++
	假链状双歧杆菌NK101	++	+	+
	最小双歧杆菌NK102	+	+	+

[0225] *-, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0226] (5) 实验结果

[0227] 作为评估分离的乳酸菌活性的结果, 鉴定出分离的乳酸杆菌属或双歧杆菌属乳酸菌中, 本文的罗伊氏乳酸杆菌NK33和青春双歧杆菌NK98在促进抗氧化活性和抑制炎症反应方面具有非常优异的作用。尤其是, 确定罗伊氏乳酸杆菌NK33和青春双歧杆菌NK98抑制NF- κ B的活性, NF- κ B被称为诱导衰老相关疾病(如阿尔茨海默氏病)的物质; 抑制存在于衰老、痴呆等的小神经胶质细胞的炎症反应; 并增加由脑神经产生但在衰老、痴呆等中减少的脑源性神经营养因子(BDNF)的表达(表5和6)。

[0228] 实施例8: 评估分离的双歧杆菌属乳酸菌的免疫调节作用

[0229] 为了评估从粪便中分离双歧杆菌属乳酸菌的免疫调节作用, 测定了双歧杆菌属乳酸菌对巨噬细胞和脾细胞的免疫反应的作用。

[0230] (1) 巨噬细胞的免疫反应

[0231] 向C57BL/6小鼠(6周, 雄性, 20-23g, Raonbio公司)腹膜内施用2ml无菌的4%巯基乙酸盐。给药后96小时内, 麻醉小鼠, 然后向小鼠腹膜内施用8ml RPMI 1640培养基。在5至10分钟后, 从小鼠腹膜内提取RPMI培养基(包括巨噬细胞), 然后以1000rpm离心10分钟, 然后再次用RPMI 1640培养基洗涤两次。以每孔 0.5×10^6 个细胞将所述巨噬细胞铺展在24孔板上, 然后培养24小时, 然后除去未贴壁的细胞并使用。

[0232] 将所述巨噬细胞培养液用青春双歧杆菌NK98和炎症反应诱导剂脂多糖处理2小时或24小时, 然后得到上清液和细胞, 其中用于处理乳酸菌的浓度为 1×10^4 CFU/ml。将获得的细胞置入RIPA缓冲液(Gibco公司)中并混匀。用ELISA试剂盒测定获得的上清液中TNF- α 的表达水平, 然后通过免疫印迹法测定获得的细胞中p65(NF- κ B)、p-p65(磷-NF- κ B)和 β -肌动蛋白的表达水平。特别地, 取50 μ g上清液, 并在SDS 10%(w/v)聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳1.5小时。将经过电泳的样品在100V和400mA的条件下转移到硝酸纤维素纸上, 1小时10分

钟。将已转移样品的硝酸纤维素纸用5%脱脂奶封闭30分钟,然后用PBS-吐温洗涤3次,每次5分钟,然后与一抗(美国圣克鲁兹生物技术公司)以1:1000的比例反应过夜。之后,将这种纸洗涤3次,每次10分钟,并与二抗(美国圣克鲁兹生物技术公司)以1:1000的比例反应1小时20分钟。然后,将这种纸洗涤3次,每次15分钟,之后进行荧光和发光,然后显影,然后测量发色团带的强度,其结果如下表7所示。

[0233] 表7

	菌株名	NF- κ B抑制能力 (p-p65/p65)	TNF- α 抑制能力
[0234]	未处理的	-	-
	青春双歧杆菌NK98	+	++

[0235] *抑制率:-, <10%;+, 10~30%;++, 30~60%;+++, >60

[0236] (2) 脾细胞的免疫反应

[0237] 分离并破碎C57BL/6小鼠(6周,雄性,20-22g, OrientBio公司)的脾脏,然后将其悬浮在含有10%FCS的RPMI 1640培养基中。用CD4T细胞分离试剂盒(美天旎生物技术, 贝尔吉施格拉德巴赫, 德国)从其中分离CD4T细胞,然后将分离的CD4T细胞以每孔 5×10^5 个细胞分至12孔板。

[0238] 培养细胞,加入抗CD3、抗CD28、IL-2和IL-12以诱导T细胞分化为Th1细胞;加入抗CD3、抗CD28、IL-2和IL-4以诱导T细胞分化为Th2细胞;加入抗CD3、抗CD28、IL-6和TGF- β 诱导T细胞分化为Th17细胞;加入抗CD3和抗CD28诱导T细胞分化为Treg细胞,然后以每孔 1×10^5 CFU/ml向其中加入乳酸菌,然后培养4天。

[0239] 之后,测量从脾分离的T细胞分化为Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞和Treg细胞的分化能力。特别地,用抗FoxP3或抗IL-17A抗体对培养液的细胞进行染色,然后通过FACS(荧光激活细胞分选)装置(C6流式细胞仪系统,美国加利福尼亚州圣何塞)分析Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞和Treg细胞的分布情况,其结果如下表8所示。

[0240] 表8

	菌株名	分化抑制率			分化增加率
		Th1 细胞	Th2 细胞	Th17 细胞	Treg细胞
[0241]	未处理的	-	-	-	-
	长双歧杆菌NK81	+	++	+	+
	长双歧杆菌NK82	+	++	+	+
	长双歧杆菌NK83	+	++	++	+

	长双歧杆菌NK84	+++	+	+++	++
	两歧双歧杆菌NK85	+++	+	+++	++
	两歧双歧杆菌NK86	+	+	+++	+
	婴儿双歧杆菌NK87	+	+	+++	++
	婴儿双歧杆菌NK88	+	+	+++	+
	婴儿双歧杆菌NK89	+	+	+++	+
	短双歧杆菌NK90	+	+++	++	++
	短双歧杆菌NK91	++	++	+	+
[0242]	小猪双歧杆菌NK92	-	+	+	-
	链状双歧杆菌NK93	+	++	++	+
	链状双歧杆菌NK94	++	+	+	++
	青春双歧杆菌NK95	++	+	+	+
	假长双歧杆菌NK96	++	++	++	+
	青春双歧杆菌NK97	+	++	+	+
	青春双歧杆菌NK98	++	++	+++	+++
	青春双歧杆菌NK99	+	+	++	+
	假链状双歧杆菌NK100	++	++	+	+
	假链状双歧杆菌NK101	+	++	+	+
	最小双歧杆菌NK102	+	+	+	+

[0243] *抑制率:-, <10%;+, 10-30%;++, 30-60%;+++, >60

[0244] *增加率:-, <10%;+, 10-50%;++, 50-100%;+++, >100%

[0245] 另外,测定从脾T细胞分离的Th1细胞、Th2细胞、Th17细胞和Treg细胞的转录因子和细胞因子的表达率。特别地,通过qRT-PCR分析Th1细胞分化诱导培养液中的T-bet、IFN- γ 和IL-12的表达水平;Th2细胞分化诱导培养液中的GATA3和IL-5;Th17细胞分化诱导培养液中的ROR γ t和IL-17;以及Treg细胞分化诱导培养液中的Foxp3和IL-10,其结果如下表9所示。

[0246] 表9

菌株名	表达抑制率						表达增加率	
	T-bet	IFN- γ	GATA3	IL-5 细胞	ROR γ t	IL-17	FOXp3	IL-10
未处理的	-	-	-	-	-	-	-	-
[0247] 长双歧杆菌NK81	++	+	+	+	+	+	-	+
长双歧杆菌NK82	+	+	+	+	+	+	+	+
长双歧杆菌NK83	+	+	+	+	+	+	+	+
长双歧杆菌NK84	++	++	+	+	+++	+++	++	++
两歧双歧杆菌NK85	+++	+++	+	+	+	+	++	++

	两岐双歧杆菌NK86	-	-	+	+	+	+	+	+
	婴儿双歧杆菌NK87	+	+	+	+	+	+	+	+
	婴儿双歧杆菌NK88	+	+	++	++	+	+	+	+
	婴儿双歧杆菌NK89	+	+	+	+	++	++	+	+
	短双歧杆菌NK90	+	+	+++	+++	++	++	++	++
	短双歧杆菌NK91	+	+	+	+	+	+++	++	+
	小猪双歧杆菌NK92	+	+	+	+	+	++	+	++
	链状双歧杆菌NK93	+	+	+	+	+	+	+	+
[0248]	链状双歧杆菌NK94	++	+	+	+	+	+	+	+
	青春双歧杆菌NK95	+	+	+	+	++	++	++	++
	假长双歧杆菌NK96	+	+	+	+	+	+	+	+
	青春双歧杆菌NK97	+	+	+	+	+	+	+	+
	青春双歧杆菌NK98	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
	青春双歧杆菌NK99	+	++	+	+	+	+	+	+
	假链状双歧杆菌NK100	++	+	+	+	-	-	+	+
	假链状双歧杆菌NK101	++	+	+	+	-	-	+	+
	最小双歧杆菌NK102	+	+	+	+	+	-	-	-

[0249] *抑制率:-, <10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, >60

[0250] *增加率:-, <10%; +, 10-50%; ++, 50-100%; +++, >100%

[0251] 如以上表8和表9所示,确定青春双歧杆菌NK98对T细胞分化为Th1细胞、Th2细胞和Th17细胞具有高抑制率,特别是对T细胞分化为Treg细胞具有高增长率,因此有效地抑制了炎症反应,并相应地有效地改善了炎性疾病。

[0252] 实施例9:罗伊氏乳酸杆菌NK33对减轻应激的作用

[0253] 从对小鼠进行束缚应激过程后第7天起,每天一次向小鼠施用 1×10^9 cfu新型乳酸杆菌罗伊氏乳酸杆菌NK33或生理盐水溶液,持续5天,其中小鼠已经受如上述实验实施例1所述的束缚应激。根据实验实施例2至5,对上述小鼠进行实验。

[0254] 作为实施实验实施例2的结果,在施用生理盐水溶液的组(IS)中,发现在高架十字迷宫测试中OT和OE降低;在明暗转换测试中明区时间减少;并且在玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为增加。但是,在罗伊氏乳酸杆菌NK33给药组(IS+LR)中,发现OT和OE升高;明区时间增加;并且在玻璃珠埋试验中玻璃珠埋行为减少(图14(a)至(c))。

[0255] 在施用生理盐水溶液的组(IS)中,海马中的NF- κ B活性(p-p65/p65)增加;脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平降低;血液中皮质脂酮、IL-6、TNF- α 和脂多糖的量增加。但是,在罗伊氏乳酸杆菌NK33给药组(IS+LR)中,发现NF- κ B活性(p-p65/p65)被抑制;脑源性神经营养因子(BDNF)的表达水平增加;并且血液中的皮质脂酮、IL-6、TNF- α 和脂多糖的量减少(图14(d)至(g))。

[0256] 作为进行实验实施例5的结果,在施用生理盐水溶液的组 (IS) 中,确定作为结肠炎的指标,结肠的长度减少;髓过氧化物酶增加;结肠的TNF- α 升高;结肠COX-2和iNOS的表达增加;并且NF- κ B活性增加。但是,在罗伊氏乳酸杆菌NK33给药组 (IR) 中,确定结肠的长度已恢复到正常水平;髓过氧化物酶降低;结肠的TNF- α 降低;结肠COX-2和iNOS的表达降低;并且NF- κ B活性被抑制(图15 (a) 至 (d))。

[0257] 根据该结果,可以确认新型乳酸杆菌罗伊氏乳酸杆菌NK33具有改善如焦虑、抑郁、应激等精神疾病的优异效果。

[0258] 实施例10:青春双歧杆菌NK98对减轻应激的作用

[0259] 从对小鼠进行束缚应激过程后第7天起,每天一次向小鼠施用 1×10^9 cfu新型乳酸杆菌青春双歧杆菌NK98 (NK98)、 1×10^9 cfu青春双歧杆菌IM38 (IM38),生理盐水溶液 (IS) 或1mg/kg丁螺环酮,持续三天,其中小鼠经受如上述实验实施例1所述的束缚应激。然后根据实验实施例2至5进行实验。

[0260] (1) 高架十字迷宫测试

[0261] 连同上述实验实施例2- (1) 的高架十字迷宫测试一起,检测血液中皮质脂酮 (BC) 的量,其结果如下表10所示。

[0262] 表10

	焦虑小鼠			抑郁小鼠		
	OT (%)	OE (%)	BC (ng/mL)	OT (%)	OE (%)	BC (ng/mL)
正常对照	17.1	35.2	0.8	18.2	38.5	0.7
[0263] IS	5.2	16.1	2.8	3.4	13.5	7.4
NK98	16.2	34.1	1.2	16.2	32.3	3.5
IM38	14.3	32.6	1.5	13.3	28.6	4.1
丁螺环酮	16.7	33.8	1.2	15.7	29.8	3.8

[0264] 如上表10所示,在施用生理盐水溶液的束缚应激模型组 (IS) 中,与没有束缚应激的正常对照组相比,发现在高架十字迷宫测试中OT和OE均降低。但是,在施用青春双歧杆菌NK98的组中,发现开放臂滞留时间 (OT) 和开放臂进入 (OE) 的频率增加;以及血液中的皮质脂酮含量显著降低,因此显示出与青春双歧杆菌IM38相比更优异的效果。

[0265] (2) 明暗转换测试

[0266] 根据以上实验实施例2- (2),进行明暗过渡试验,其结果如下表11所示。

[0267] 表11

	明区时间 (%)	转换数
[0268] 正常对照	46.5	23.5
IS	23.1	13.8
[0269] NK98	39.4	21.9
IM38	35.8	18.3
丁螺环酮	40.1	19.6

[0270] 如上表11所示,在施用生理盐水溶液的应激模型组 (IS) 中,与没有束缚应激的正常对照组相比,明区时间减少,但在青春期双歧杆菌NK98给药组中,与青春双歧杆菌IM38给药组相比,明区时间增加。

[0271] (3) 强迫游泳测试

[0272] 根据以上实验实施例2- (4), 进行强迫游泳试验, 其结果如下表12所示。

[0273] 表12

	静止时间 (%)
正常对照	28.5
IS	46.7
NK98	31.2
IM38	38.2
丁螺环酮	32.1

[0275] 如上表12所示, 确认与无束缚应激的正常对照组相比, 给予生理盐水溶液的抑郁小鼠模型组 (IS) 的静止时间增加; 与给予青春双歧杆菌IM38的组相比, 青春双歧杆菌NK98给药组的静止时间减少。

[0276] (4) 尾部悬挂测试 (TST)

[0277] 根据以上实验实施例2- (5), 进行尾部悬挂试验 (TST), 其结果如下表13所示。

[0278] 表13

	静止时间 (%)
正常对照	21.5
IS	37.9
NK98	24.2
IM38	26.9
丁螺环酮	25.2

[0280] 如上表13所示, 确认与没有束缚应激的正常对照组相比, 施用生理盐水溶液的抑郁小鼠模型组 (IS) 的静止时间增加; 但青春双歧杆菌NK98给药组的静止时间减少。

[0281] (5) 生物标志物的测定

[0282] 在对抑郁小鼠进行最后一次行为实验后的两个小时内, 将其麻醉, 并通过ELISA测定血液中的皮质脂酮, 并通过与上述实验实施例5相同的方法用免疫印迹法测定脑源性神经营养因子 (BDNF) 和大脑的NF- κ B以及结肠的NF- κ B, 其结果如下表14所示。

[0283] 表14

	NF- κ B活化抑制能力	BDNF表达水平	血液皮质脂酮 (ng/mL)
正常对照			0.7
IS	-	-	7.4
NK98	+++	+++	3.5
IM38	++	++	4.1
丁螺环酮	-	-	3.8

[0286] *-, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0287] 如上表14所示, 在给予生理盐水溶液的组 (IS) 中, 发现海马中的NF- κ B活性 (p-p65/p65) 增加; 脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达水平降低; 并且血液中皮质脂酮的量增

加。但是,在施用NK98的组中,发现NF- κ B的活性被抑制;BDNF的表达水平增加;并且血液中皮质脂酮的量减少,其中,与施用IM38的组相比,这种效果非常优异。

[0288] (6) 改善结肠炎的效果

[0289] 在实验实施例1中对焦虑的小鼠进行最后一次行为实验后的两个小时,将鼠麻醉,并用实验实施例5所示相同的方法测量结肠长度以及MPO、COX-2、TNF- α 和NF- κ B的活化,其结果如下表15所示。

[0290] 表15

	结肠长度 (cm)	MPO 抑制能力	炎性指标抑制率		
			NF- κ B	COX-2	TNF- α
正常对照	6.2				
[0291] IS	5.1	-	-	-	-
NK98	5.7	+++	+++	+++	+++
IM38	5.5	+++	++	++	++
丁螺环酮	5.2	+	+	+	+

[0292] *-, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0293] 如上表15所示,发现与没有束缚应激的正常对照组相比,施用生理盐水溶液的束缚应激模型组(IS)的结肠长度减少,MPO和炎症指标增加。但是给予青春双歧杆菌NK98的组恢复了结肠长度,并改善了MPO抑制能力和炎性指标。

[0294] (7) 减轻抗生素诱导应激的作用

[0295] 根据实验实施例2至5,对小鼠进行实验,其中以与实验实施例1-(2)中所示相同的方法已经连续两天对小鼠进行氨苄青霉素(100mg/kg)给药使其经受抗生素应激,其结果如下表16和17所示。

[0296] 表16

	开放臂滞留时间 (%)	开放臂进入 (%)	血液皮质脂酮 (ng/mL)
正常对照	16.8	33.5	0.8
[0297] IS	4.9	13.4	3.2
NK98	14.3	30.5	1.6
IM38	12.9	29.2	1.9
丁螺环酮	14.1	31.3	1.6

[0298] 表17

	结肠长度 (cm)	MPO 抑制能力	炎性指标抑制率		
			NF- κ B	COX-2	TNF- α
正常对照	6.3				
[0299] IS	5.4	-	-	-	-
NK98	6.1	+++	+++	+++	+++
IM38	5.8	++	++	++	++
丁螺环酮	5.5	+	+	+	+

[0300] *-, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0301] 如上表16所示,发现施用生理盐水溶液的抗生素诱导的应激模型组(IS),与正常

对照组相比,在高架十字迷宫测试中,OT和OE降低;施用青春双歧杆菌NK98的组,OT和OE的频率增加,血液中皮质脂酮的量显著降低,其中,与青春双歧杆菌IM38相比,这种效果是优异的。

[0302] 如上表17所示,发现施用生理盐水溶液的抗生素诱导的应激模型组(IS),与正常对照组相比,结肠长度减少,MPO和炎症指标增加;施用青春双歧杆菌NK98的组,结肠长度恢复,并改善了MPO抑制能力和炎症指标。

[0303] 实施例11:青春双歧杆菌NK98对改善认知功能的作用

[0304] 在对小鼠腹膜内给予从大肠杆菌分离的LPS(0.5mg/kg/天)5天后的第二天,给予乳酸菌,进行对象识别测试和Y迷宫测试,并通过免疫印迹法测定海马中的BDNF,来鉴定乳酸菌改善认知功能的作用,其结果如下表18所示。

[0305] 特别地,作为对象识别测试方法,将形状和大小相同的两个物件(A,A')固定在一个从里面看不到外面的箱子(40×40×40cm)中,然后允许小鼠开始在箱子中心移动,记录10分钟内接触两个对象的次数。在24小时后,将其中一物件替换为新物件(A,B),然后记录并量化了旧物件和新物件的接触次数。

[0306] 另外,作为Y迷宫测试方法,测试设备由三个相同的臂(长8cm,宽30cm,高14cm)组成,每个臂以120°的角度定位。将小鼠放在一只臂的末端,并使其在Y形迷宫中自由移动八分钟,然后测量进入各臂的数量和顺序,以评估自发改变(%).改变定义为字母符号顺序,其中小鼠顺序进入三个臂,即ABC,BCA,CAB等。

[0307] $\text{改变}\% = [\text{改变总数}] / [\text{臂进入总数} - 2] \times 100$

[0308] 表18

[0309]

	对象识别测试(%)	Y迷宫测试(%)	海马BDNF表达能力
正常对照	52.1	76.5	
IS	38.5	56.7	-
NK98	48.6	68.4	+++
IM38	46.5	64.5	++
丁螺环酮	42.9	62.4	+

[0310] *-, <10%; +, 10~30%; ++, 30~50%; +++, >50%

[0311] 如上表18所示,通过对象识别测试和Y迷宫测试,在给予青春双歧杆菌NK98的组中,确认认知功能得到改善并且BDNF的表达增加。

[0312] 实施例12:根据共同施用两种乳酸菌减轻应激的效果

[0313] 彼此比较新型乳酸菌罗伊氏乳酸杆菌NK33、韩国专利公开号10-2017-0090359号中公开的细菌青春双歧杆菌IM38(保藏号:KCCM11807P)、或它们的混合物减轻应激的效果。

[0314] 特别地,将生理盐水溶液(IS)、 1×10^9 cfu罗伊氏乳酸杆菌NK33(NK33)、 1×10^9 cfu青春双歧杆菌IM38(IM38)、或上述乳酸菌各 0.5×10^9 的组合(NK33+IM38)施用给具有如上述实验实施例1-(1)所示诱导的束缚应激的模型中,然后进行高架十字迷宫测试。之后,从各组收集血液,然后测量血液中的皮质脂酮的量,其结果如下表19所示。

[0315] 表19

	开放臂滞留时间 (%)	开放臂进入 (%)	血液皮质脂酮 (ng/mL)
[0316] 正常对照	16.1	34.0	0.9
IS	5.4	16.1	2.4
NK33	14.1	33.5	1.4
IM38	14.8	31.5	1.5
NK33+IM38	17.3	36.5	1.2

[0317] 如上表19所示,发现与单独施用乳酸菌的组相比,共同施用组中开放臂滞留时间和开放臂进入增加,且血液中皮质脂酮的量显著减少。

[0318] 另外,通过与上述NK33和IM38的联用实验中所示的相同方法,比较了罗伊氏乳酸杆菌NK33和青春双歧杆菌NK98的混合物对减轻应激的作用,其结果如下表20所示。

[0319] 表20

	开放臂滞留时间 (%)	开放臂进入 (%)	血液皮质脂酮 (ng/mL)
[0320] 正常对照	18.1	34.2	0.9
IS	5.5	17.1	2.9
NK33	14.1	33.5	1.4
NK98	16.8	33.3	1.3
NK33+NK98	18.5	38.2	1.1

[0321] 如上表20所示,发现与单独施用乳酸菌的组相比,在共同施用组中开放臂滞留时间和开放臂进入增加并且血液中皮质脂酮的量显著减少。

[0322] <乳酸菌的保藏信息>

[0323] 为了专利目的本发明人于2017年8月4日将罗伊氏乳酸杆菌NK33保藏于经认证的保藏机构韩国微生物培养中心(地址:韩国首尔西大门区弘济内2号街支路儒林大厦45楼),并获得保藏号KCCM12090P。

[0324] 同样,为了专利目的本发明人于2018年8月3日将青春双歧杆菌NK98保藏于经认证的保藏机构韩国微生物培养中心(地址:韩国首尔西大门区弘济内2号街支路儒林大厦45楼),并获得保藏号KCCM12297P。

**国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约
国际表格**

根据条约7.1在本页底部标识国际保藏单位发出原始保藏情况下接收

致：金东铉

韩国首尔东大门区庆熙路26号(02447)

[0325]

I. 微生物的鉴定	
保藏者给出的识别号： 罗伊氏乳酸杆菌NK33 <i>(Lactobacillus reuteri NK33)</i>	国际保藏单位给出的保藏编号： KCCM12090P
II. 科学描述和/或建议的分类学指定	
上述I中鉴定的微生物伴随着： [] 科学的描述 [] 建议的分类学指定 (在适用的地方标记十字)	
III. 接收和接受	
该国际保藏单位接受上述I中确定的微生物， 于2017年8月04日收到微生物。	
IV. 国际保藏单位	
名称： 韩国微生物培养中心 地址：儒林大厦45楼， 弘济内2号街支路，西大门区 首尔03641，韩国	有权代表国际保藏单位或授权官员 的人签名： 日期：2017年8月04日

该翻译证明与原始文本的内容没有区别

2018年9月28日

专利代理师：安素瑛



**国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约
国际表格**

根据条约7.1在本页底部标识国际保藏单位发出原始保藏情况下接收

致：金东铉

韩国首尔东大门区庆熙路26号(02447)

[0326]

I. 微生物的鉴定	
保藏者给出的识别号： 青春双歧杆菌NK98 <i>(Bifidobacterium adolescentis NK98)</i>	国际保藏单位给出的保藏编号： KCCM12297P
II. 科学描述和/或建议的分类学指定	
上述I中鉴定的微生物伴随着： [] 科学的描述 [] 建议的分类学指定 (在适用的地方标记十字)	
III. 接收和接受	
该国际保藏单位接受上述I中确定的微生物， 于2018年8月03日收到微生物。	
IV. 国际保藏单位	
名称： 韩国微生物培养中心 地址：儒林大厦45楼， 弘济内2号街支路，西大门区 首尔03641，韩国	有权代表国际保藏单位或授权官员 的人签名： 日期：2018年8月03日

该翻译证明与原始文本的内容没有区别

2018年9月28日

专利代理师：安素瑛



- [0001] 序列表
- [0002] <110> 庆熙大学校产学协力团
- [0003] 株式会社那笔制药
- [0004] <120> 新型乳酸菌及其应用
- [0005] <130> P17-120-REA-KHU
- [0006] <160> 38
- [0007] <170> KoPatentIn 3.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 1490
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0012] <400> 1
- [0013] tatggtcag gatgaacgcc ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgtac gcaactggccc 60
- [0014] aactgattga tgggtccttc acctgattga cgatggatca ccagtgagt gcgacgggt 120
- [0015] gagtaacacg taggtaacct gccccggagc gggggataac atttgaaac agatgctaata 180
- [0016] accgcataac aacaaaagcc acatggcttt tgtttgaaag atggctttgg ctatcactct 240
- [0017] gggatggacc tgcggtgcat tagctagttg gtaaggtaac ggcttaccac ggcgatgatg 300
- [0018] catagccgag ttgagagact gatcgccac aatggaactg agacacggtc catactccta 360
- [0019] cgggaggcag cagtagggaa tcttcacaa tgggcgcaag cctgatggag caacaccgcg 420
- [0020] tgagtgaaga aggtttcgg ctctgaaagc tctgtgttg gagaagaacg tgcgtgagag 480
- [0021] taactgttca cgcagtgac gtatccaacc agaaagtac ggctaactac gtgccagcag 540
- [0022] ccgcgtaat acgtaggtg caagcgttat ccgatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag 600
- [0023] gcggttgcct aggtctgatg tgaagcctt cggcttaacc gaagaagtgc atcggaacc 660
- [0024] gggcgacttg agtgcagaag aggacagtgg aactccatgt gtagcggtag aatgcgtaga 720
- [0025] tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg ctgtctggtc tgcaactgac gctgaggctc 780
- [0026] gaaagcatgg gtagcgaaca ggattagata ccctgtagt ccatgccgta aacgatgagt 840
- [0027] gctaggtgtt ggagggttc cgccctcag tgccggagct aacgcattaa gcaactccgc 900
- [0028] tggggagtac gaccgcaagg ttgaaactca aaggaattga cgggggccc cacaagcgg 960
- [0029] ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcttgcg 1020
- [0030] ctaaccttag agataaggcg ttccctcgg ggacgcaatg acaggtggtg catggtcgtc 1080
- [0031] gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgaacc cttgttacta 1140
- [0032] gttgccagca ttaagtggg cactctagt agactgccg tgacaaccg gaggaagggt 1200
- [0033] gggacgacgt cagatcatca tgcccttat gacctggct acacacgtc tacaatggac 1260
- [0034] ggtacaacga gtcgaagct cgcgagagta agctaactc ttaaagccg tctcagttcg 1320
- [0035] gactgtaggc tgcaactgc ctacacgaag tcggaatgc tagtaatgc ggatcagcat 1380
- [0036] gcccggtga atacgtccc gggccttga cacaccgcc gtcacaccat ggggagtttg 1440
- [0037] taacgcccac agtcggtggc ctaacctta tggagggagc cgcctaaggc 1490
- [0038] <210> 2
- [0039] <211> 25
- [0040] <212> DNA
- [0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0042] <400> 2
[0043] ggagyatgtg gtttaattcg aagca 25
[0044] <210> 3
[0045] <211> 20
[0046] <212> DNA
[0047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048] <400> 3
[0049] agctgacgac aacctgcac 20
[0050] <210> 4
[0051] <211> 22
[0052] <212> DNA
[0053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0054] <400> 4
[0055] gtttaattcg atgatacgcg ag 22
[0056] <210> 5
[0057] <211> 19
[0058] <212> DNA
[0059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0060] <400> 5
[0061] ttaasccgac acctcacgg 19
[0062] <210> 6
[0063] <211> 22
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0066] <400> 6
[0067] aacgcgaaaa accttaccta cc 22
[0068] <210> 7
[0069] <211> 22
[0070] <212> DNA
[0071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0072] <400> 7
[0073] tgccctttcg tagcaactag tg 22
[0074] <210> 8
[0075] <211> 21
[0076] <212> DNA
[0077] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0078] <400> 8
[0079] gctaacgcat taagtryccc g 21
[0080] <210> 9
[0081] <211> 18
[0082] <212> DNA
[0083] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0084] <400> 9
[0085] gccatgcr gc acctgtct 18
[0086] <210> 10
[0087] <211> 22
[0088] <212> DNA
[0089] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0090] <400> 10
[0091] taggcttgac attgatagaa tc 22
[0092] <210> 11
[0093] <211> 21
[0094] <212> DNA
[0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0096] <400> 11
[0097] cttacgaagg cagtctcctt a 21
[0098] <210> 12
[0099] <211> 18
[0100] <212> DNA
[0101] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0102] <400> 12
[0103] tgtagcggtg gaatgcgc 18
[0104] <210> 13
[0105] <211> 21
[0106] <212> DNA
[0107] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0108] <400> 13
[0109] aattaagcca catgctccgc t 21
[0110] <210> 14
[0111] <211> 19
[0112] <212> DNA
[0113] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0114] <400> 14
[0115] aytgggcgta aagagttgc 19
[0116] <210> 15
[0117] <211> 22
[0118] <212> DNA
[0119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0120] <400> 15
[0121] tacggytacc ttgttacgac tt 22
[0122] <210> 16
[0123] <211> 21
[0124] <212> DNA
[0125] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0126] <400> 16
[0127] tcakgtcagt atggccctta t 21
[0128] <210> 17
[0129] <211> 23
[0130] <212> DNA
[0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0132] <400> 17
[0133] cagttttyag gatttcctcc gcc 23
[0134] <210> 18
[0135] <211> 25
[0136] <212> DNA
[0137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0138] <400> 18
[0139] cattgacgtt acccgcagaa gaagc 25
[0140] <210> 19
[0141] <211> 21
[0142] <212> DNA
[0143] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0144] <400> 19
[0145] ctctacgaga ctcaagcttg c 21
[0146] <210> 20
[0147] <211> 24
[0148] <212> DNA
[0149] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0150] <400> 20
[0151] cgcgtactat acgcatgaa cgta 24
[0152] <210> 21
[0153] <211> 22
[0154] <212> DNA
[0155] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0156] <400> 21
[0157] accgttgatc acttcggtca gg 22
[0158] <210> 22
[0159] <211> 24
[0160] <212> DNA
[0161] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0162] <400> 22
[0163] gatacggagt atgcctttac ggtg 24
[0164] <210> 23
[0165] <211> 24
[0166] <212> DNA
[0167] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0168] <400> 23
[0169] tagcctttat caagcggata ctgg 24
[0170] <210> 24
[0171] <211> 21
[0172] <212> DNA
[0173] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0174] <400> 24
[0175] gttaataacct ttgctcattg a 21
[0176] <210> 25
[0177] <211> 21
[0178] <212> DNA
[0179] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0180] <400> 25
[0181] accagggtat ctaatcctgt t 21
[0182] <210> 26
[0183] <211> 25
[0184] <212> DNA
[0185] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0186] <400> 26
[0187] ctgcacccat cagatgaacc catat 25
[0188] <210> 27
[0189] <211> 29
[0190] <212> DNA
[0191] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0192] <400> 27
[0193] caaagcatct ctgctaagtt ctctggatg 29
[0194] <210> 28
[0195] <211> 16
[0196] <212> DNA
[0197] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0198] <400> 28
[0199] gaacgcaytg gcccaa 16
[0200] <210> 29
[0201] <211> 19
[0202] <212> DNA
[0203] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0204] <400> 29
[0205] tcattgtgg ccgatcagt 19
[0206] <210> 30
[0207] <211> 20
[0208] <212> DNA
[0209] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0210] <400> 30
[0211] cactagacgc atgtctagag 20
[0212] <210> 31
[0213] <211> 20
[0214] <212> DNA
[0215] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0216] <400> 31
[0217] agtctctcaa ctcggtatg 20
[0218] <210> 32
[0219] <211> 20
[0220] <212> DNA
[0221] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0222] <400> 32
[0223] tcatgattta catttgatg 20
[0224] <210> 33
[0225] <211> 21
[0226] <212> DNA
[0227] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0228] <400> 33
[0229] gaccatgagg tccaagttg t 21
[0230] <210> 34
[0231] <211> 20
[0232] <212> DNA
[0233] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0234] <400> 34
[0235] cgccttaac agcagcttc 20
[0236] <210> 35
[0237] <211> 20
[0238] <212> DNA
[0239] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0240] <400> 35
[0241] gccctccgta tgcttaaacc 20
[0242] <210> 36
[0243] <211> 52
[0244] <212> DNA
[0245] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0246] <400> 36
[0247] tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggtgccag cmgcccgggt aa 52
[0248] <210> 37
[0249] <211> 54
[0250] <212> DNA
[0251] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0252] <400> 37
[0253] gtctcgtggg ctgggatg tgtataagag acagggacta chvgggtwtc taat 54
[0254] <210> 38
[0255] <211> 1460
[0256] <212> DNA
[0257] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0258] <400> 38
[0259] ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgaacgggat cccaggagct 60
[0260] tgctcctggg tgagagtggc gaacgggtga gtaatgctg accgacctgc cccatacacc 120
[0261] ggaatagctc ctggaacgg gtgtaatgc cggatgctcc agttggatgc atgtccttct 180
[0262] gggaaagatt catcggtatg ggatggggtc gcgtcctatc agcttgatgg cggggtaacg 240
[0263] gcccaccatg gcttcgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ttgggactga 300
[0264] gatacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgcaagc 360
[0265] ctgatgcagc gacgcccggt gcgggatgac ggccttcggg ttgtaaaccg cttttgactg 420
[0266] ggagcaagcc cttcgggggtg agtgtacctt tcgaataagc accggctaac tacgtgccag 480
[0267] cagcccggtt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattgggcgt aaagggctcg 540
[0268] taggcggttc gtcgctccg gtgtgaaagt ccatcgctta acggtggatc cgcgccgggt 600
[0269] acggcgggc ttgagtgcgg taggggagac tggaattccc ggtgtaacgg tggaatgtgt 660
[0270] agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggtctctg ggccgtcact gacgtgagg 720
[0271] agcгааagcg tggggagcga acaggattag atacctgggt agtccacgcc gtaaacgggt 780
[0272] gatgctggat gtggggacca ttccacggtc tccgtgctcg agccaacgcg ttaagcatcc 840
[0273] cgctggggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg cccgcacaag 900
[0274] cggcgagca tgcggattaa ttgatgcaa cgcaagaac cttacctggg cttgacatgt 960
[0275] tcccagacagc cccagagatg ggcctccct tcggggcggg ttcacagggtg gtgcatggtc 1020
[0276] gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc accctcgccc 1080
[0277] tgtgttgcca gcacgtcgtg gtgggaactc acgggggacc gccgggtca actcggagga 1140
[0278] aggtggggat gacgtcagat catcatgccc cttacgtcca gggcttcacg catgctacaa 1200
[0279] tggccggtac aacgggatgc gacactgtga ggtggagcgg atcccttaa accggtctca 1260
[0280] gttcggattg gagtctgcaa cccgaactca tgaaggcgga gtcgctagta atcgggatc 1320
[0281] agcaacgccg cggatgaatgc gttcccgggc cttgtacaca ccgccgtca agtcatgaaa 1380
[0282] gtggtagca cccgaagccg gtggccaac ctttttgggg ggagccgtct aaggtgagac 1440
[0283] tcgtgattgg gactaatcta 1460

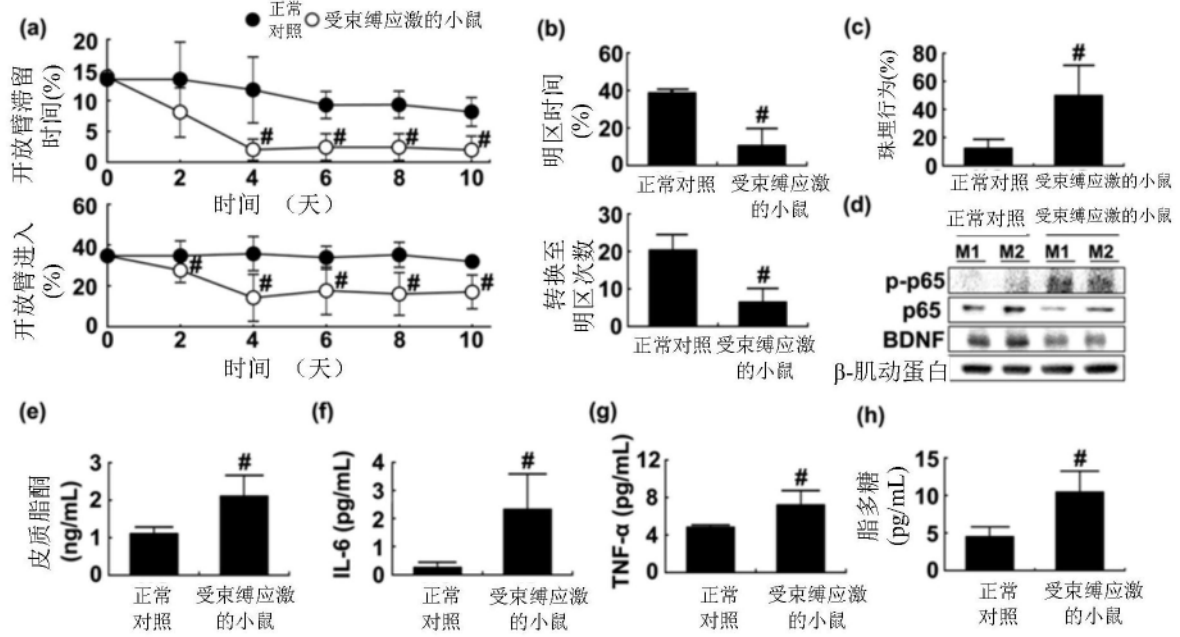


图1

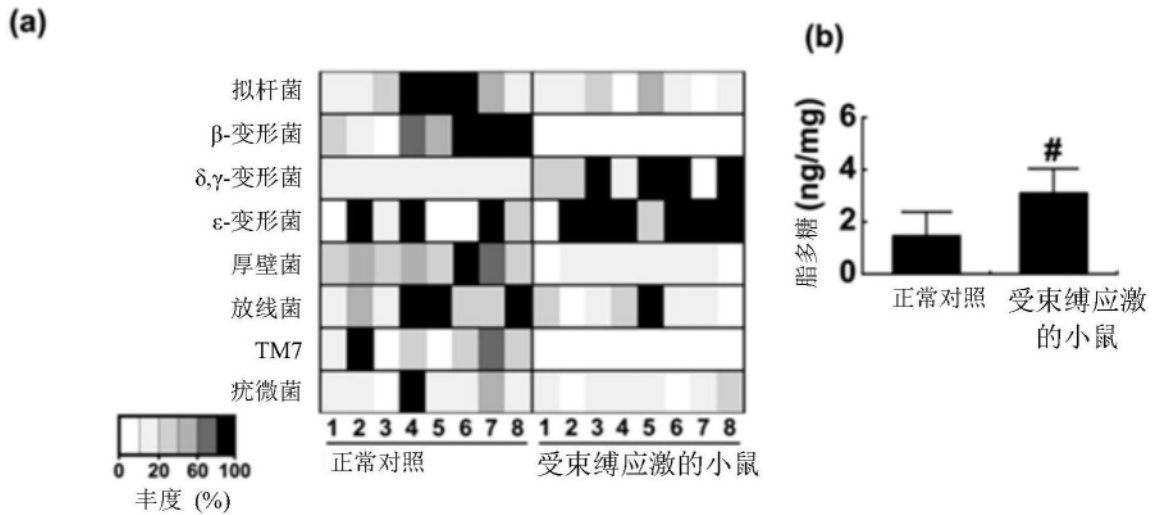


图2

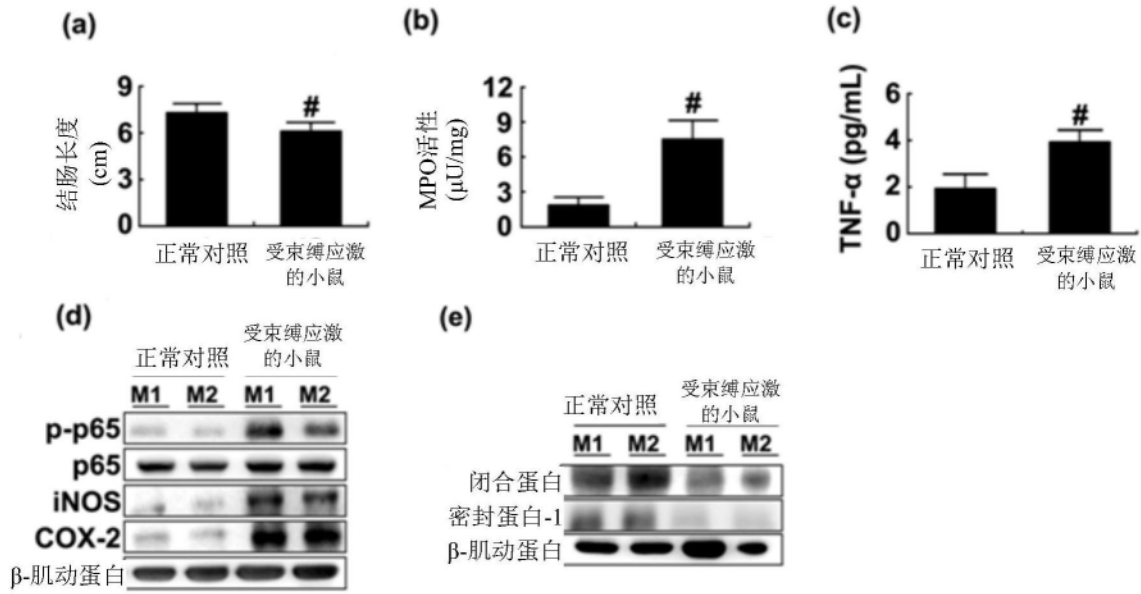


图3

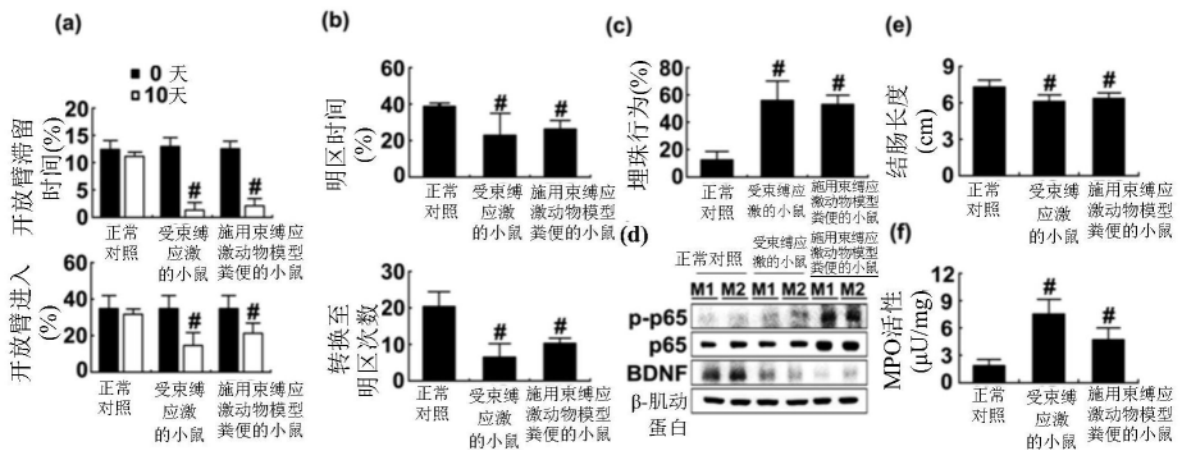


图4

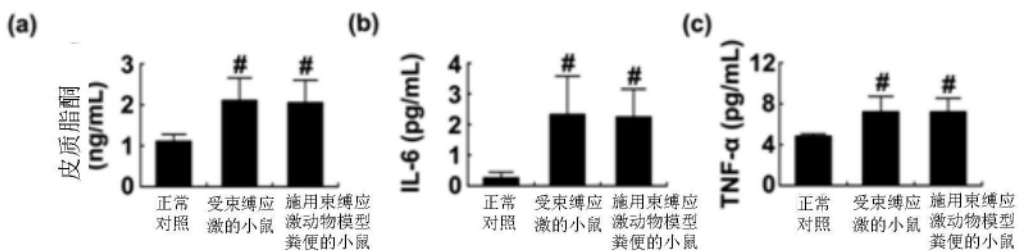


图5

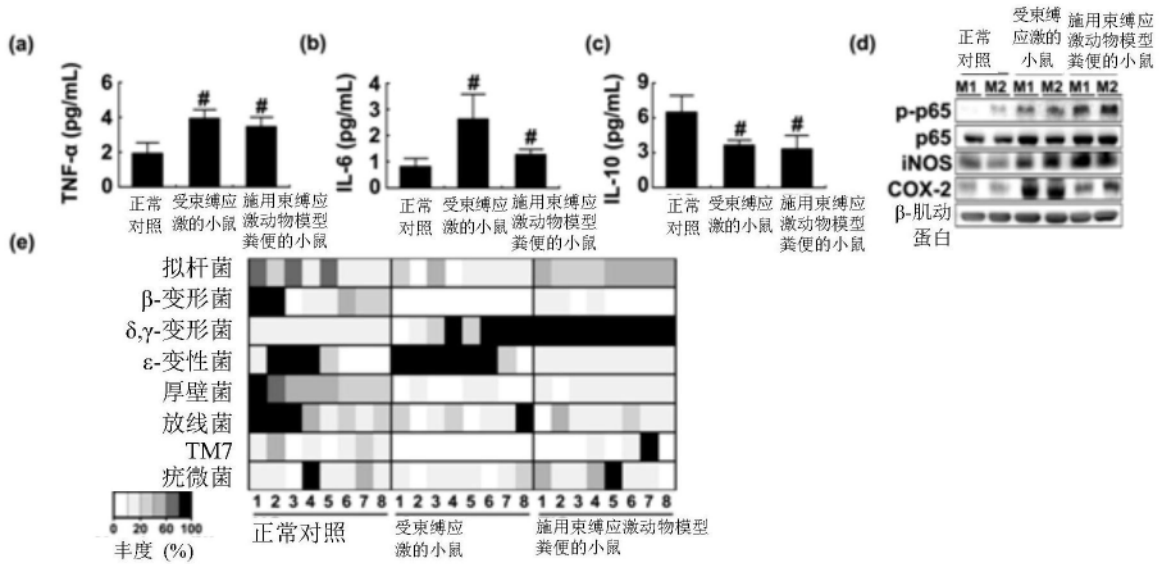


图6

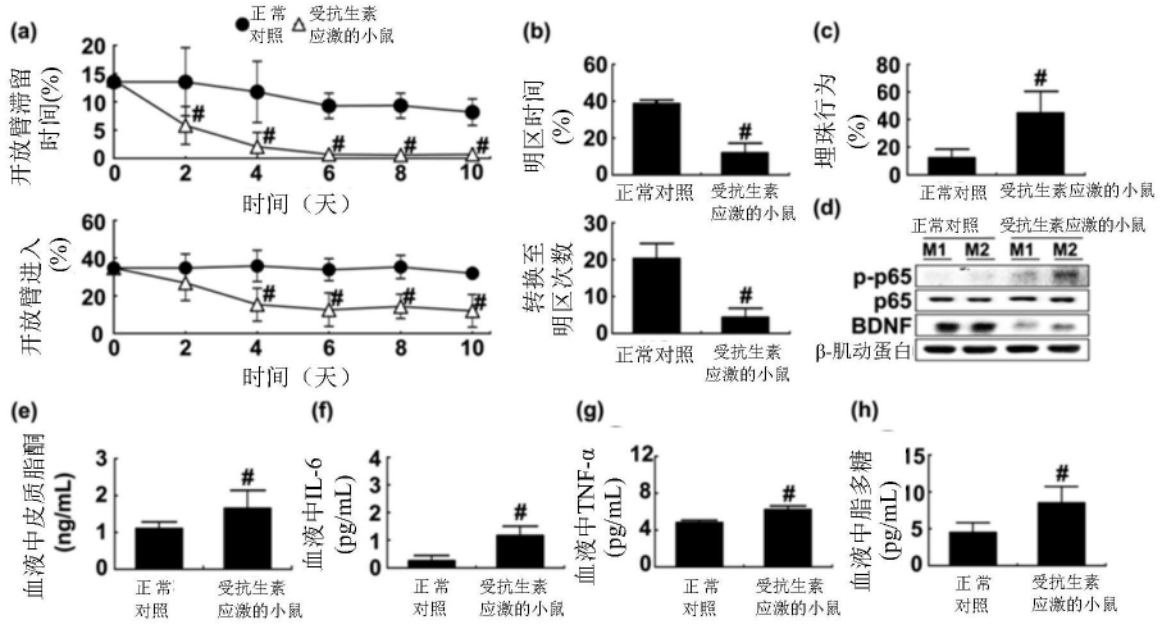


图7

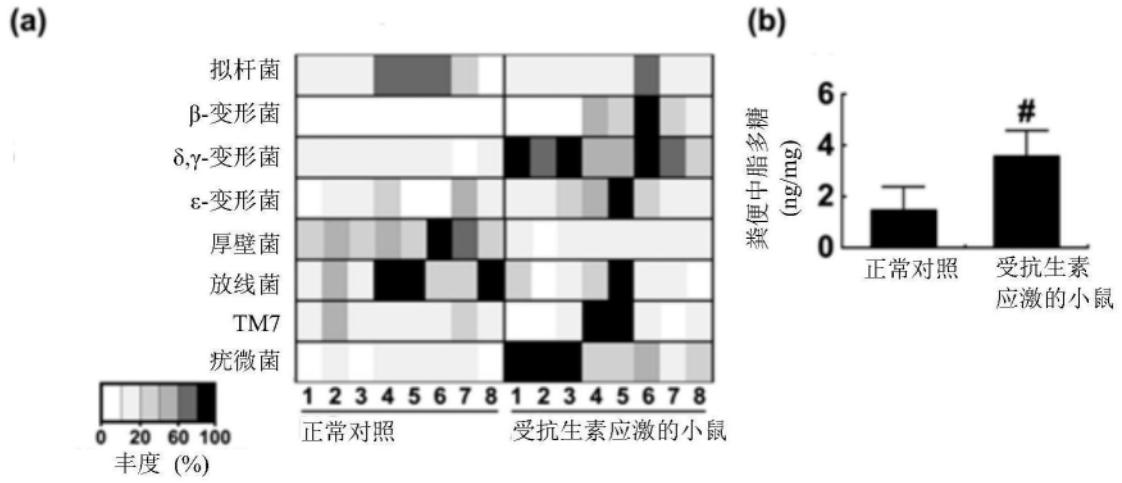


图8

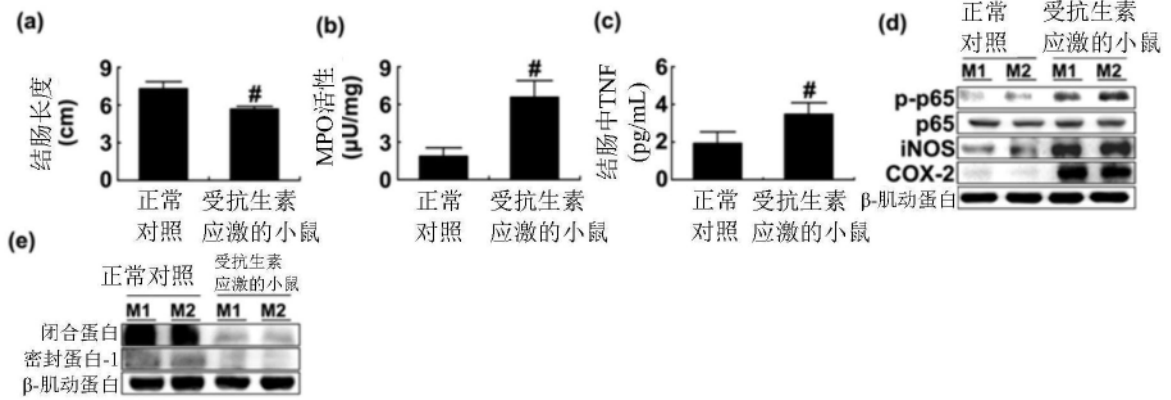


图9

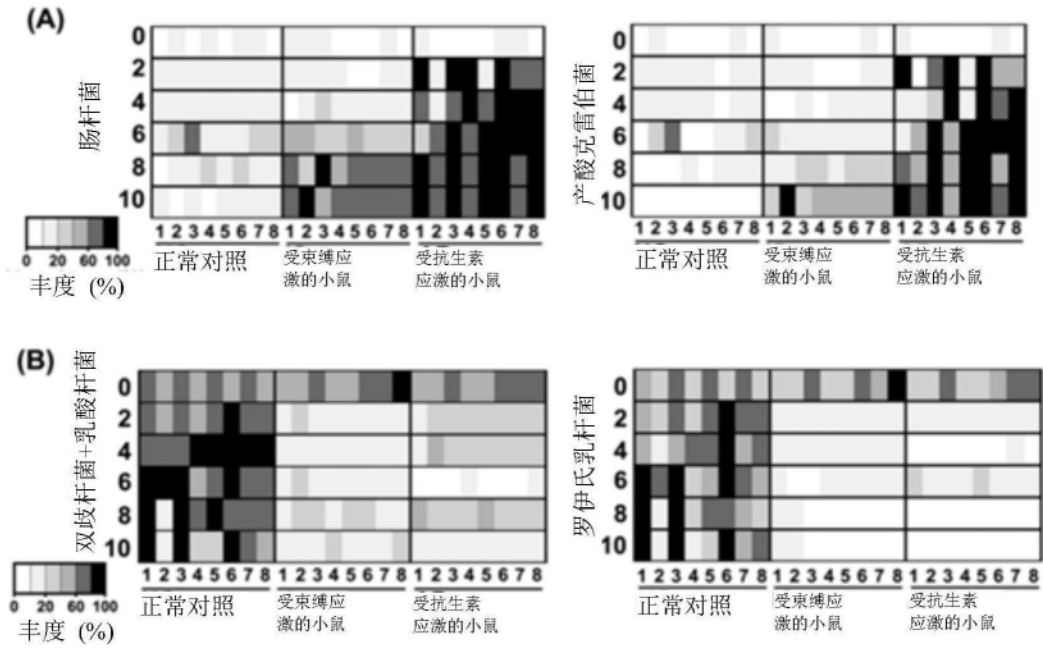


图10

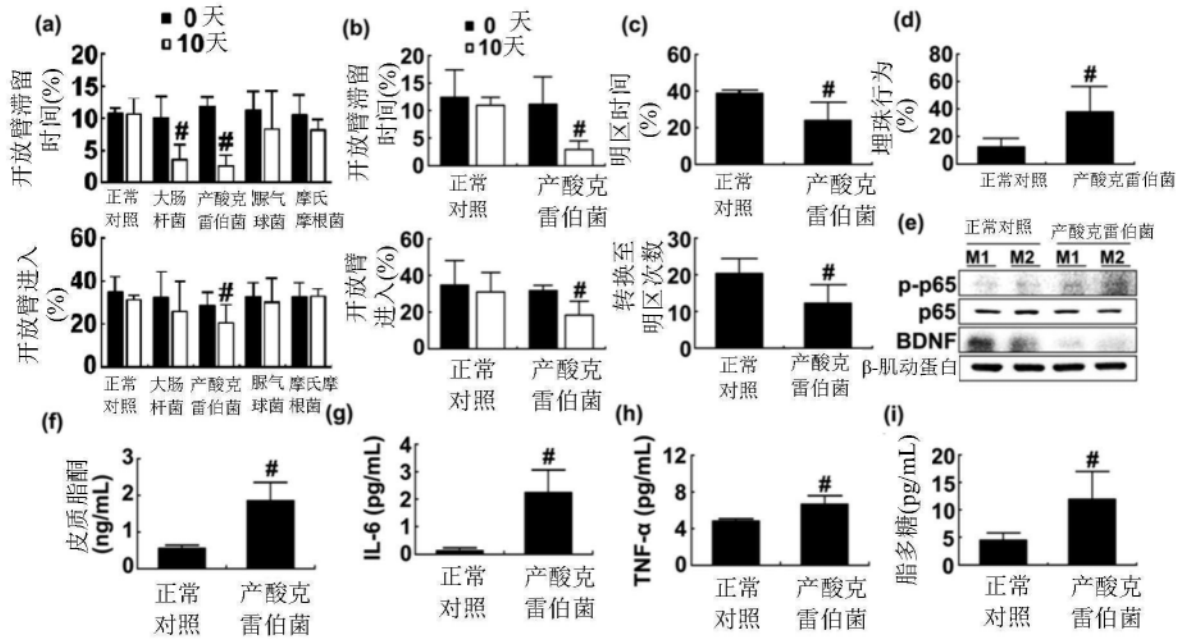


图11

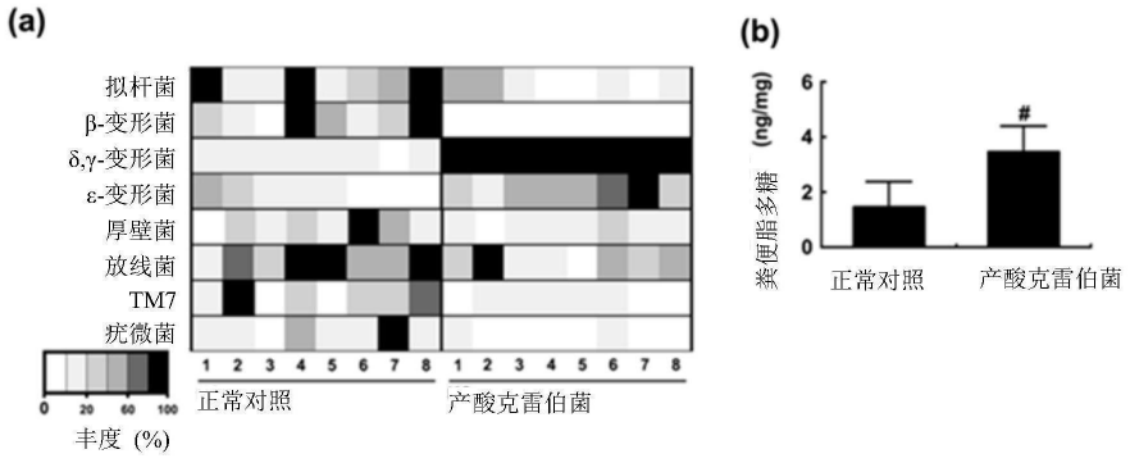


图12

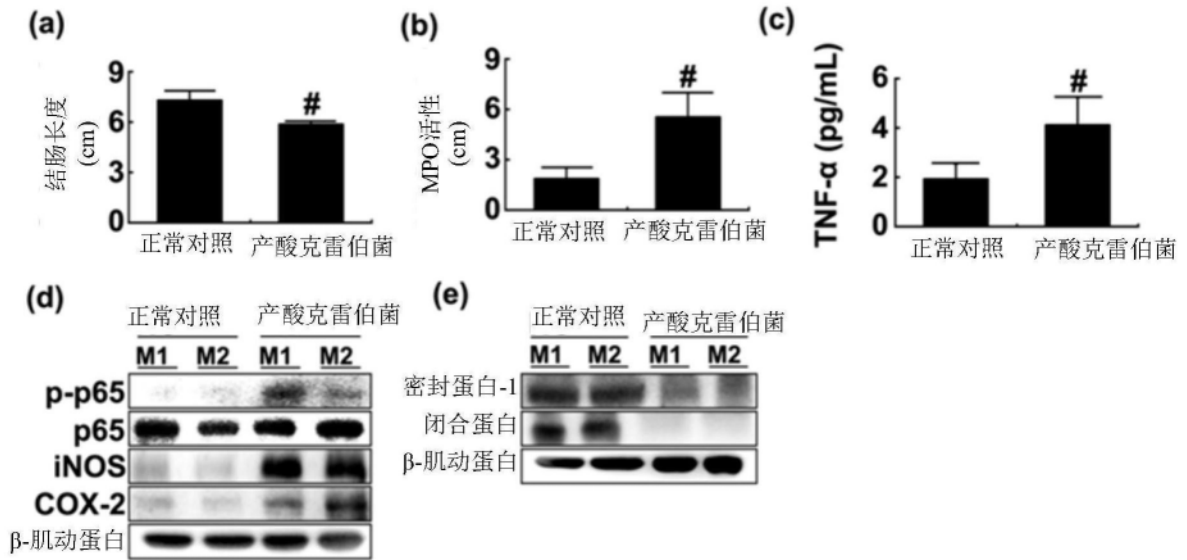


图13

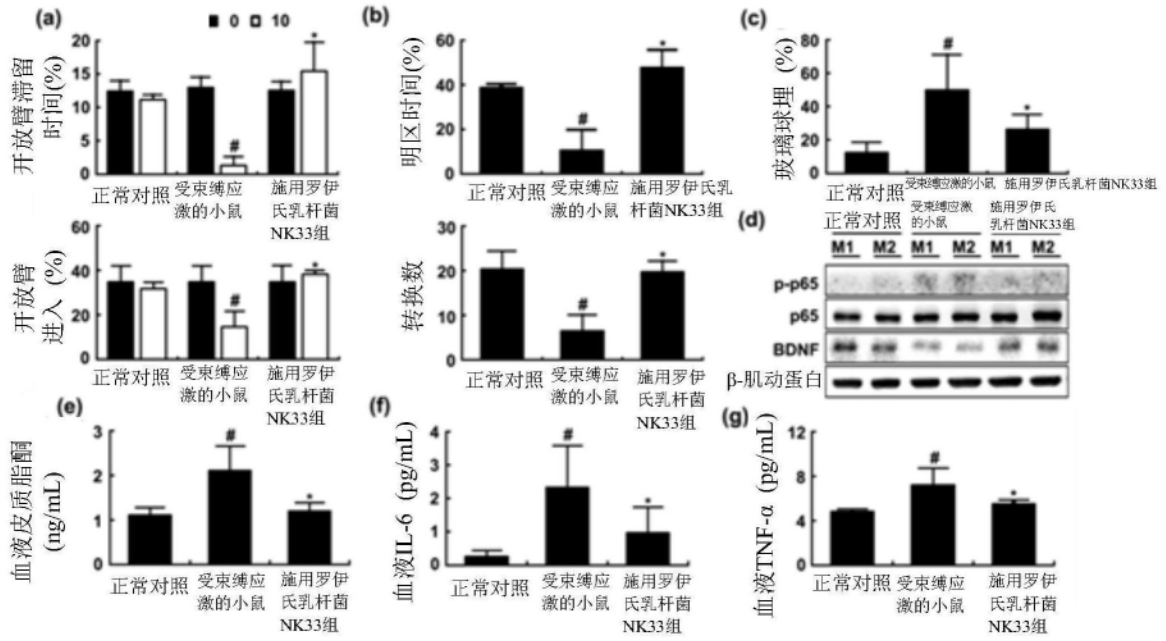


图14

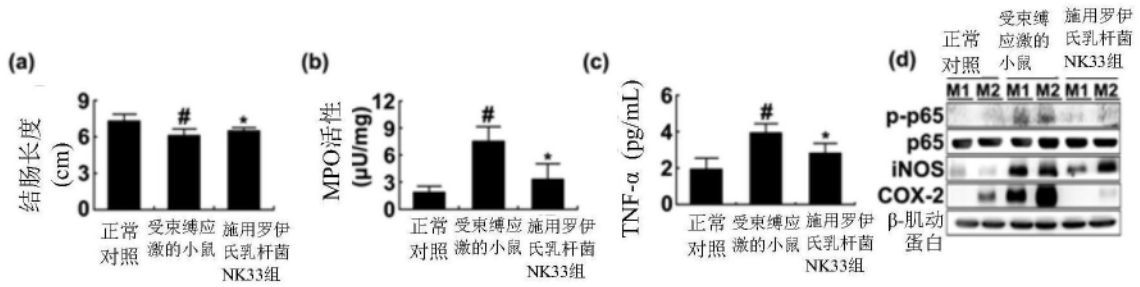


图15