



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108004187 A

(43)申请公布日 2018.05.08

(21)申请号 201810026176.2

(22)申请日 2018.01.11

(83)生物保藏信息

CGMCC No.14109 2017.05.10

(71)申请人 广东龙创基药业有限公司

地址 521000 广东省潮州市潮州大道北端
东侧潮州经济开发区管委会办公大楼
五楼535房

申请人 赵湘江

(72)发明人 李煜龙 陈贵浩 潘立 黄旭藩

许少燕 姚耀宏 赵湘江

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事

务所(普通合伙) 12219

代理人 占国霞

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A61K 35/747(2015.01)

A61P 31/02(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 31/10(2006.01)

A61P 15/02(2006.01)

A61P 33/02(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

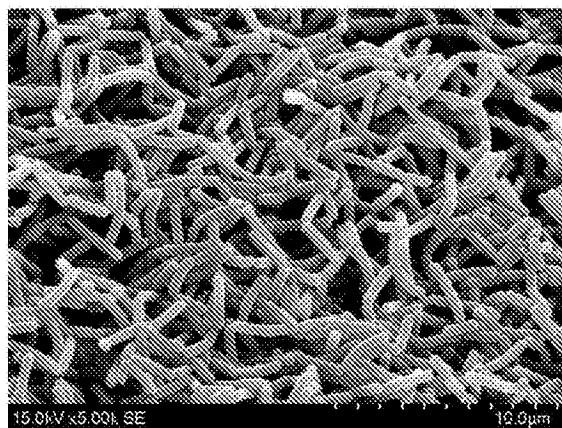
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

一种格氏乳杆菌及其用于制备阴道抑菌药物的应用

(57)摘要

本发明提供了一种格氏乳杆菌及其用于制备阴道抑菌药物的应用,该格氏乳杆菌保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏编号为CGMCC No.14109。研究其代谢性能发现,相对普通格氏乳杆菌,该菌株具备较强的乳酸和过氧化氢生产能力,对致病菌的抑菌能力很强,同时具有突出的阴道上皮细胞粘附能力。基于以上发现的新性质,本发明确定了利用其制备阴道抑菌药物的新用途,可实现多种细菌性阴道疾病的治疗。利用本发明菌剂对细菌性阴道疾病效果显著,且安全无毒、稳定性好、可长期保存,还涉及其在预防和/或治疗妇科疾病中的用途。



1. 一种格氏乳杆菌,其保藏编号为CGMCC No.14109。
2. 一种DNA分子,其特征在于所述DNA分子提取自权利要求1所述格氏乳杆菌,以其为模板利用16s-rDNA通用引物扩增,扩增产物序列与GenBank数据库中格氏乳杆菌碱基序列二者同源性大于98%。
3. 权利要求1所述格氏乳杆菌用于制备阴道致病菌抑菌药物的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所述药物是菌剂,该菌剂在阴道环境中定殖并存活于阴道上皮细胞上。
5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所述药物是菌剂,该菌剂在阴道环境中代谢产H₂O₂。
6. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所述致病菌是阴道加德纳氏菌或阿托波菌。
7. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于所述致病菌是白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌或沙门氏菌。
8. 权利要求1所述格氏乳杆菌用于制备阴道疾病预防或治疗药物的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于所述阴道疾病是外阴阴道假丝酵母菌病、滴虫性阴道炎、老年性阴道炎、非特异性阴道感染或混合性阴道感染。

一种格氏乳杆菌及其用于制备阴道抑菌药物的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,进一步涉及阴道微生态环境的调节及细菌性阴道疾病的治疗,具体涉及一种格氏乳杆菌及其用于制备阴道抑菌药物的应用。

背景技术

[0002] 健康妇女阴道内存在多种微生物,它们与宿主、环境之间构成了相互制约、相互协调、动态平衡的阴道微生态系统。健康妇女的阴道菌群主要由乳杆菌构成,包括植物乳杆菌、詹氏乳杆菌、格氏乳杆菌、卷曲乳杆菌、阴道乳杆菌、格氏乳杆菌等。正常情况下乳杆菌对阴道可以起到保护作用,当阴道微生态的乳杆菌紊乱可以导致致病菌入侵而产生阴道炎。

[0003] 细菌性阴道病(BV)的发生是由于阴道菌群失调,寄主自身的乳杆菌减少而导致其他条件性病原微生物如加德纳菌、各种厌氧菌、弯曲弧菌等的大量繁殖,通常BV实际上是以加德纳氏菌为主的一种混合感染。应用抗生素治疗,可暂时缓解BV的症状,但也使本已减少的乳杆菌进一步减少,加重阴道微生态失调,从而使BV反复复发。如何控制复发、彻底根治细菌性阴道病是妇产科医生亟需解决的棘手问题。

[0004] 研究表明:产 H_2O_2 和乳酸的乳杆菌是健康妇女阴道内的优势菌,是保护女性阴道免受病原体感染的重要因素,另外乳杆菌代谢产生的酸和一些抗微生物因子也可有效地抑制其他细菌的生长繁殖。

[0005] 健康妇女阴道内存在多种乳杆菌,具有个体差异性,且乳杆菌各株间抗致病菌能力差异明显。选择乳杆菌益生菌时,需要综合考虑乳杆菌的种类,其产酸、产 H_2O_2 能力,及与阴道上皮细胞粘附的能力,其中乳杆菌能否在阴道成功定植,是乳杆菌持续作用的基础,也是乳杆菌发挥疗效的关键因素。目前市面已有制品“德氏乳杆菌”实际并非我国妇女阴道优势菌群,定植能力较差,也不能维持稳定的活菌含量,不能满足妇科临床的需求。

[0006] 格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*),为乳杆菌属,是人体正常菌群之一,广泛分布于人体肠道中,在女性阴道中也有分布。现有技术中,格氏乳杆菌主要用于刺激免疫细胞分泌抗过敏相关细胞激素;此外,还可通过自身菌群优势改善肠道菌群特征,因而对于常规菌株而言,在现有技术的认知范畴中格氏乳杆菌不具有特异性的抑菌作用。

发明内容

[0007] 本发明旨在提供一种特定的格氏乳杆菌,以解决现有技术中常规格氏乳杆菌不具有阴道致病菌抑制能力的技术问题。

[0008] 本发明要解决的另一技术问题是常规格氏乳杆菌产过氧化氢生产能力较低。

[0009] 本发明要解决的再一技术问题是常规格氏乳杆菌的乳酸产量较低。

[0010] 本发明要解决的又一技术问题是现有技术中常规格氏乳杆菌在阴道中的定殖、存活效果不佳。

[0011] 本发明要解决的又一技术问题是现有技术中针对阴道致病菌的菌剂类抑菌药物

治疗效果不佳。

[0012] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0013] 一种分离的格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*),本发明中将其编号为RD-0046 (格氏乳杆菌),保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏编号为CGMCC No.14109。

[0014] 上述格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) RD-0046为中国健康育龄妇女阴道分泌物中筛选得来,已于2017年5月10日保藏于在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),保藏单位地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏登记号为CGMCC No.14109,该菌株的分类命名为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)。

[0015] 上述分离的格氏乳杆菌RD-0046,采用16SrDNA进行测序,与GenBank数据库中格氏乳杆菌碱基序列同源性分值大于98%。

[0016] 在以上技术方案的基础上,本发明进一步提供了上述格氏乳杆菌用于制备阴道致病菌抑菌药物的应用。

[0017] 作为优选,所述药物是菌剂,该菌剂在阴道环境中定殖并存活于阴道上皮细胞上。

[0018] 作为优选,所述药物是菌剂,该菌剂在阴道环境中代谢产H₂O₂。

[0019] 作为优选,所述致病菌是阴道加德纳氏菌。

[0020] 作为优选,所述致病菌是阿托波菌。

[0021] 作为优选,所述致病菌是白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌或沙门氏菌等。

[0022] 同时,本发明进一步提供了上述格氏乳杆菌用于制备阴道疾病预防或治疗药物的应用。

[0023] 作为优选,所述阴道疾病是外阴阴道假丝酵母菌病、滴虫性阴道炎、老年性阴道炎、非特异性阴道感染或混合性阴道感染。

[0024] 本发明首先分离得到了一株格氏乳杆菌,研究其代谢性能发现,该菌株具备优良的乳酸生产能力和产过氧化氢能,对致病菌的抑菌能力很强,同时具有突出的阴道上皮细胞粘附能力。基于以上发现的新性质,本发明确定了利用其制备阴道抑菌药物的新用途,实现了多种细菌性阴道疾病的治疗。

[0025] 采用上述技术方案产生的有益效果在于:(1)本发格的氏乳杆菌RD-0046菌株可以长期保存,并抵抗细菌性阴道病和各种阴道感染,包括白色念珠菌性阴道炎,淋病,病毒性阴道炎,以及泌尿道感染等。(2)本发格的氏乳杆菌直接采集于健康人体,具有活跃稳定的生物学特性,无需驯化和复壮工艺,直接进入制剂工艺即可。(3)本发格的氏乳杆菌具有抑制加德纳氏菌、抑制白色念珠菌的作用,与市售对照菌相比较、具有优势的阴道上皮细胞黏附力,具有在灵长类动物阴道定植的优势能力。

附图说明

[0026] 图1是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046菌落形态的正面照片;

[0027] 图2是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046的革兰氏染色镜检照片;

[0028] 图3是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046的16SrDNA基因PCR扩增产物的

电泳图；

[0029] 图4是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046的乳酸检测图谱；

[0030] 图5是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-046过氧化氢显色5min和10min图片；

[0031] 图6是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046对卡那霉素、氟罗沙星和阿莫西林/克拉维酸的抗生素敏感性试验菌落图；

[0032] 图7是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046 (左) 和德氏乳杆菌 (右) 对阴道加德纳菌的抑菌效果照片；

[0033] 图8是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046 (左) 和德氏乳杆菌 (右) 对沙门氏菌的抑菌效果照片；

[0034] 图9是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046 (左) 和德氏乳杆菌 (右) 对铜绿假单胞菌的抑菌效果照片；

[0035] 图10是本发明具体实施方式中格氏乳杆菌RD-0046定植食蟹猴阴道后食蟹猴阴道微生物区部分菌株16SrDNA片段PCR扩增产物的电泳图；

[0036] 图11是本发明格氏乳杆菌RD-0046的扫描电镜图。

具体实施方式

[0037] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中属于公知的结构或功能将不进行详细描述。除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0038] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0039] 以下实施例中所用到的细菌培养基成分及配制方法如下:

[0040] 1、肉汤固体培养基(MRS)配制:

[0041] (1) 将琼脂粉配成溶液,1.5g/100ml去离子水;

[0042] (2) 加入MRS培养基17.91g/100ml琼脂溶液,混匀;

[0043] (3) 放入灭菌锅,1.0MPa蒸汽灭菌20分钟;

[0044] (4) 待培养基温度降至室温后倒入培养皿,根据培养皿大小约10ml/个或20ml/个;

[0045] (5) 于超净台内操作。冷却后成琼脂状,标记培养基名称及配制日期,放于4℃冰箱待用。

[0046] 2、肉汤液体培养基(MRS)配制:

[0047] (1) 将MRS培养基加入去离子水,比例为17.91 g/100ml;

[0048] (2) 放入灭菌锅,1.0MPa蒸汽灭菌20分钟;

[0049] (3) 待灭菌锅无压力后取出,分装至EP管中,每个1.0ml。标记培养基名称及配制日期,放于4℃冰箱待用。

[0050] 3、过氧化氢(H₂O₂) 鉴定培养基配制:

[0051] (1) 同肉汤固体培养基(MRS) 配制步骤(1)至(4);

[0052] (2) 待灭菌锅无压力后取出,稍冷却,但仍为液体状态时于超净台内加入TMB(终浓度0.25mg/ml)、HRP(终浓度0.01mg/ml),混匀;

[0053] (3) 待培养基温度降至约45℃后倒入培养皿,冷却后成琼脂状,标记培养基名称及配制日期,放于4℃冰箱待用。

[0054] 实施例1(格氏乳杆菌RD-0046菌群的分离和接种、纯化、增菌培养)

[0055] 1、格氏乳杆菌RD-0046菌群的分离和接种:用两个无菌棉拭子采集受试者阴道侧壁上的分泌物,24小时内以不同浓度接种于装有配制好的MRS培养基的培养皿,并标记信息,将培养皿置于厌氧罐中,并放入CO₂产气袋,置于37℃孵育箱,孵育48h以上。

[0056] 2、格氏乳杆菌菌株RD-0046的纯化、增菌培养:按照菌落不同形态(表面、边缘等)、大小分别计数,形态相同、大小一致的记为一种,接种环挑取单个菌落中少许细菌,按“斜线法”接种至MRS固体培养基以得到分离纯化的单菌落;菌牙签挑取MRS固体培养基上的单菌落少许细菌,接种至MRS液体培养基,置于37℃孵育箱,厌氧培养24h-48h,筛选出新的菌株。

[0057] 实施例2(格氏乳杆菌RD-0046菌株的鉴定及保藏)

[0058] 1、培养特性、染色镜检及形态学特征:培养后得到的菌落如附图1,菌落圆形、边缘整齐、表面光滑、较扁平、半透明;取该菌纯培养物涂片进行革兰氏染色,结果如附图2,革兰氏染色呈阳性,细杆状,端钝圆,呈链状或细丝状排列,结果表明:所分离菌株初步判定为乳杆菌属。

[0059] 2、16SrDNA基因序列鉴定:以细菌基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取,并采用引物对27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'),1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'),进行PCR扩增,取PCR产物进行凝胶电泳,确定16SrDNA基因片段,在约1500bp处得到单一清晰的PCR产物条带,见附图3中。将PCR产物进行纯化及DNA序列测定,采用Sanger测序法,测序引物对为27F/1492R,测序仪器ABI3730XL,测序结果与GenBank数据库比对,其与格氏乳杆菌同源性相似度大于99%。最终鉴定的属种为格氏乳杆菌。其16SrDNA的可变区序列见序列表SEQ ID NO:1。

[0060] 3、生理生化特征:通过七叶苷水解试验、甲基红试验(MR试验)、乙酰甲基甲醇试验(VP试验)、靛基质试验、三糖铁试验、克氏双糖铁试验、尿素酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、氨基酸脱羧酶试验、明胶液化试验、丙二酸钠试验、柠檬酸盐实验(枸橼酸盐实验)、硝酸盐还原试验、石蕊牛奶试验、细菌动力试验测定菌株生理生化反应,所得结果如表1所示:

[0061] 表1格氏乳酸杆菌RD0046的生理生化特性实验结果

[0062]

生理生化项目	结果
七叶苷水解试验	+
甲基红试验(MR试验)	+
乙酰甲基甲醇试验(VP试验)	-
靛基质试验	-
三糖铁试验	-
克氏双糖铁试验	-
尿素酶试验	-
苯丙氨酸脱氨酶试验	-
氨基酸脱羧酶试验	-
明胶液化试验	-

丙二酸钠试验	-
柠檬酸盐实验(枸橼酸盐实验)	-
硝酸盐还原试验	-
石蕊牛奶试验	凝固产酸
细菌动力试验	-

[0063] +:表示阳性;-:表示阴性

[0064] 采用法国梅里埃公司生产的API 50CHL乳杆菌鉴定系统对菌株进行生化鉴定,鉴定结果统计如表2所示

[0065] 表2格氏乳酸杆菌RD-0046API 50CH试验条反应结果

[0066]

项目	结果	项目	结果
对照	-	柠檬酸铁	+

[0067]

甘油	-	水杨苷	+
赤藓糖醇	-	D-纤维二糖	+
D-阿拉伯糖	-	D-麦芽糖	d
L-阿拉伯糖	-	D-乳糖	d
D-核糖	-	D-蜜二糖	d
D-木糖	-	D-蔗糖	+
L-木糖	-	D-海藻糖	d
D-侧金盏花醇	-	菊糖	-
β -甲基-D-吡喃木糖 苷	-	D-松三糖	+
D-半乳糖	+	D-棉子糖	d
D-葡萄糖	+	淀粉	-
D-果糖	+	糖原	-
D-甘露糖	+	木糖醇	-
L-山梨糖	-	D-龙胆二糖	+
L-鼠李糖	-	D-土伦糖	+
卫矛醇	-	D-来苏糖	-
肌醇	-	D-塔格糖	-
D-甘露醇	-	D-岩藻糖	-
D-山梨醇	-	L-岩藻糖	-
α -甲基-D-吡喃甘露 糖苷	+	D-阿拉伯糖醇	+
α -甲基-D-吡喃葡萄 糖苷	-	L-阿拉伯糖醇	-
N-乙酰葡萄糖胺	+	葡聚糖酸钾	+
熊果苷	+	2-酮基-葡萄糖酸钾	-
七叶灵	+	5-酮基-葡萄糖酸钾	-

[0068] +:表示阳性;-:表示阴性;d:表示弱阳性

[0069] 由此生化图谱判定菌株生化特性符合格氏乳杆菌的生化特性。

[0070] 3、菌株的保藏

[0071] 本发明的格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*) RD-0046 从中国健康育龄妇女阴道分泌物中筛选得来,已于2017年5月10日保藏于在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),保藏单位地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,保藏登记号为CGMCC No.14109,该菌株的分类命名为格氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)。

[0072] 实施例3(格氏乳杆菌RD-0046代谢产物测定)

[0073] 1. 格氏乳杆菌RD-0046代谢产物中乳酸含量测定:采用高效液相法(0.005M硫酸水溶液(0.28ml硫酸(98%)-1000ml水,pH约为2.1)对本菌株培养24-48h发酵液的乳酸进行检测,结果标明乳酸(L/D乳酸总和)约为35mg/mL,远高于市售德氏乳杆菌(约15mg/mL)以及常规格氏乳杆菌的乳酸含量,本发明的乳酸检测图谱参见附图4

[0074] 2. 格氏乳杆菌RD-0046代谢产物中过氧化氢含量测定:按Mcgroarty等的过氧化物酶法进行过氧化氢半定量测定,将已分离鉴定的格氏乳杆菌RD-0046接种于H₂O₂鉴定MRS-TMB平板,37℃厌氧培养24h后,取出平板,在空气中暴露菌体。产H₂O₂乳杆菌菌落将变为蓝色,而不产H₂O₂菌落不变色,根据变色时间对产生的H₂O₂进行半定量,结果见图5,图中5min时菌落已有明显蓝色显现,10min时大量蓝色明显出现,显然本菌很容易产生过氧化氢,产过氧化氢能力很强,以上结果说明本格氏乳杆菌RD-0046能产生乳酸和过氧化氢,有助于维持阴道微生态平衡。

[0075] 实施例4(抗生素敏感试验)

[0076] 按照2010年版药典第三部微生态活菌制品总论中抗生素敏感性试验的要求,采用琼脂扩散纸片法测定菌株对抗生素的敏感性,考察0代和传代30代的格氏乳杆菌RD-0046对各抗生素的敏感性,根据抑菌圈的大小判断菌株对抗生素敏感性级别,测定结果如表3所示:

[0077] 表3格氏乳酸杆菌RD0046的抗生素敏感试验结果

[0078]

产品号	产品名称	规格	C0 代抑菌圈 直径 mm	C30 代抑菌圈 直径 mm	敏感性判定
21001	氨苄西林	10ug	31.92	31.34	敏感
21002	苯唑西林	1ug	12.56	13.69	中度敏感
21003	青霉素 G	10IU	38.32	36.51	敏感
21005	庆大霉素	10ug	16.29	12.73	中度敏感
21006	卡那霉素	30ug	14.05	15.93	中度敏感
21010	四环素	30ug	31.46	30.89	敏感
21012	克林霉素	2ug	14.9	12.41	中度敏感
21013	红霉素	15 ug	32.95	31.69	敏感
21024	哌拉西林	100ug	39.45	35.88	敏感
21030	头孢曲松	30ug	31.95	24.25	敏感
21033	氟罗沙星	5ug	7.24	0	轻度敏感
21036	万古霉素	30ug	21.07	20.97	敏感
21047	阿莫西林/克拉维 酸	10 ug	37.33	31.47	敏感
21051	阿奇霉素	15ug	23.33	24.19	敏感
21058	阿莫西林	10ug	37.66	30.55	敏感
21075	美罗培南	10μg	28.43	23.5	敏感
21089	庆大霉素	120μg	22.98	22.92	敏感
210A1	杆菌肽	0.04IU	8.94	0	轻度敏感

[0079] 抑菌圈小于10mm判定为轻度敏感,在10-20mm为中度敏感,大于20mm为敏感。

[0080] 实验数据表明本菌对杆菌肽、氟罗沙星轻度敏感,对苯唑西林、卡那霉素克林霉素和庆大霉素中度敏感,对氨苄西林、青霉素G、四环素、红霉素、哌拉西林、头孢曲松、万古霉素、阿莫西林/克拉维酸、阿奇霉素、阿莫西林、美洛培南敏感。

[0081] 其中对卡那霉素、氟罗沙星和阿莫西林/克拉维酸的抗生素敏感图见附图6。

[0082] 实施例5(毒性试验)

[0083] 5只SPF级昆明种小鼠,每只小鼠腹腔注射0.3ml新鲜的格氏乳杆菌RD-0046悬浮菌液(大于 1×10^9 CFU/只鼠)。按2015版中国药典要求,每天测量每只小鼠体重,并观察、记录每只小鼠注射前后的行为和生理等变化。结果显示7天内所有动物体重均有增加,未见明显中毒症状,活动行为无异常,无动物死亡,认为该菌株属于无毒类菌株。

[0084] 实施例6(格氏乳杆菌RD-0046传代稳定性测试)

[0085] 本实施例从生长特性、形态学、生化特点、代谢物成分、抗生素敏感特性、遗传特性以及毒性测试等方面对本格氏乳杆菌菌株RD-0046进行了传代30代(C30)的稳定性考察。

[0086] 1、格氏乳杆菌RD-0046分离纯化、菌落形态观察、染色镜检及生化特性检测方法同实施例1和实施例2的第一部分。结果表明:经过传代,菌落形态见为圆形、边缘整齐、表面光滑、较扁平、半透明,传代稳定;革兰氏染色呈现为革兰氏阳性杆菌,染色镜检照片与0代没有变化。

[0087] 2、遗传特性分析:方法同实施例2的第二部分。分别对格氏乳杆菌RD-0046的第0代(C0)、第30代(C30)菌株进行16SrDNA片段PCR扩增,将PCR扩增产物电泳分析,目的条带清晰且单一,大小约为1500bp,扩增正确,C0、C30两次PCR扩增结果一致,将测得序列使用NCBI中的BLAST工具与GenBank数据库中的已知序列进行比对分析,为格氏乳杆菌,同源性相似度100%。

[0088] 3、代谢产物测定:方法同实施例3,乳酸测定含量约35mg/mL,过氧化氢实验显示各代菌落均在5min时均已出现蓝色,10min时大量蓝色明显出现,证明菌株代谢产生过氧化氢能力和产乳酸能力稳定。

[0089] 4、抗生素敏感试验:方法同实施例4,采用琼脂扩散纸片法测定菌株对抗生素的敏感性,根据药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准判定本格氏乳杆菌菌株对杆菌肽、氟罗沙星轻度敏感,对苯唑西林、卡那霉素克林霉素和庆大霉素中度敏感,对氨苄西林、青霉素G、四环素、红霉素、哌拉西林、头孢曲松、万古霉素、阿莫西林/克拉维酸、阿奇霉素、阿莫西林、美洛培南敏感。

[0090] 5、毒性试验:方法同实施例5,用小鼠腹腔注射法对本格氏乳杆菌RD-0046的C0、C30、代菌株进行了毒性测试,其中,测试的浓度 $> 10^9$ CFU/只鼠。结果为:全部受试小鼠7天内均未见中毒症状,体重均有增加,无动物死亡。根据上述结果,按《新药药理、毒理研究技术要求补充说明》,该菌株属于无毒类菌株。

[0091] 综合,本实施例将格氏乳杆菌RD-0046用MRS培养基培养多次传代,从形态学、生化学、代谢物特点及遗传特性、药敏特性、毒性试验等方面探讨了传代繁殖对格氏乳杆菌的影响。结果表明:用MRS培养传代在30代以内其形态学、生化学、遗传特性、代谢物及药敏特性与最初分离菌株一致。

[0092] 实施例7(格氏乳杆菌RD-0046菌株药效学实验)

[0093] 一、格氏乳杆菌RD-0046菌株体外抑菌实验

[0094] (1) 格氏乳杆菌RD-0046和德氏乳杆菌体外抑制阴道加德纳菌的实验:按照3%接种浓度制备格氏乳杆菌RD-0046的MRS琼脂菌饼,于37℃下厌氧培养24h,同法制备市售德氏乳杆菌菌饼;取阴道加德纳菌100μL,接种于10mL BHI固体培养基中,放入格氏乳杆菌RD-0046和德氏乳杆菌菌饼,37℃厌氧培养48h;乳杆菌周围会出现明显抑菌圈。结果见图7,其中左图为格氏乳杆菌RD-0046抑菌圈效果,游标卡尺测量抑菌圈直径为30.7mm,右图为德氏乳杆菌抑菌圈效果,抑菌直径为24.6mm,结论为格氏乳杆菌RD-0046对阴道加德纳菌的抑菌效果强于德氏乳杆菌。

[0095] (2) 格氏乳杆菌RD-0046和德氏乳杆菌体外抑制好氧致病菌的实验:按照3%接种浓度制备格氏乳杆菌RD-0046的MRS琼脂菌饼,于37℃下厌氧培养24h,同法制备市售德氏乳杆菌菌饼;将金黄色葡萄球菌,大肠埃希氏菌,铜绿假单胞菌和沙门氏菌接种在胰酪大豆胨液体(TSB)琼脂培养基,放入格氏乳杆菌RD-0046和德氏乳杆菌菌饼。于33℃培养18-24h,观察抑菌圈,游标卡尺测量RD-0046抑菌圈直径约为235mm,右图为德氏乳杆菌抑菌圈效果,抑菌直径为15.3mm,结论为格氏乳杆菌RD-0046对金黄色葡萄球菌,大肠埃希氏菌,铜绿假单胞菌和沙门氏菌的抑菌效果强于德氏乳杆菌,代表性图见附图8-9

[0096] 二、细胞黏附力实验:根据黏附在阴道上皮细胞单细胞层上的乳杆菌个数,确定不同乳杆菌的黏附性能。方法如下:取人类阴道上皮细胞Vk2/E6E7和人类子宫颈癌上皮细胞Hela,将细胞以50万每孔的密度接种于一个12孔板中,待48小时后VK2/E6E7形成单细胞层;每孔以不同数量的CFU分别加入市售乳杆菌(德氏乳杆菌)和格氏乳杆菌RD-0046,粘附4小时,粘附过程中在摇床上面轻轻振荡,各组分别设有两个平行实验;当粘附结束后,用1ml 0.05% tritonX-100裂解细胞,制成悬浮菌液,稀释,分别取100u1菌液均匀地接种于MRS琼脂培养基平板上;厌氧培养48小时后,统计每个平板的克隆数。

[0097] 结果显示:格氏乳杆菌RD-0046的4h黏附率分别为42.4%和48.2%,市售同类德氏乳杆菌菌株4h黏附率分别为11.8%和17.3%,格氏乳杆菌RD-0046的黏附力高于市售同类乳杆菌德氏乳杆菌菌株。

[0098] 三、家兔阴道定植实验

[0099] 1、实验方法

[0100] 选择4只健康动物按体重进行分层随机分组,分成2组,阳性对照组动物2只,实验组2只:

[0101] 定植用格氏乳杆菌RD-0046制备:称取格氏乳杆菌RD-0046的冷冻干燥菌粉,使定植量为 10^6 。对照组使用上市品(德氏乳杆菌胶囊),无菌操作条件下,各加入MRS液体培养基0.5mL,混合均匀,用阴道给药器全部吸取后阴道植入。

[0102] 定植造模及取样:在可观察到正常月经周期的猴子月经后,连续7天植入造模菌。每周对动物的阴道进行一次观察,检查阴道分泌物的颜色,性状及分泌量及测定阴道分泌物pH,取2只无菌棉签取样,其中一只棉签用于阴道分泌物清洁度镜检,另一支棉签用于菌群分析。

[0103] 阴道菌的分离和纯化培养:将采集的阴道分泌物,在2mL D-Hanks缓冲液中振荡,以磷酸盐缓冲液做梯度稀释,分别涂布于MRS琼脂板上并且在37℃,厌氧条件下培养24~48h。记录单菌落形态等信息,重新划线MRS琼脂板以得到纯化的菌落并进行生化和分子鉴定。

[0104] 分子生物学方法鉴定(16SrDNA基因序列分析):对所分离纯化出的菌株进行16SrDNA的序列扩增、测序及分析,将鉴定为16SrDNA片段的PCR扩增产物使用切胶回收法对目的片段纯化后进行测序。将测得的16SrDNA基因序列使用NCBI中的BLAST工具与GenBank数据库中的已知序列进行比对分析,当比对同源性大于或等于99%,则鉴定为同一物种。

[0105] 2、实验结果及分析

[0106] 阴道粘膜及分泌物一般观察:植入后每周观察一次,结果发现所有试验动物阴道粘膜分泌物未发现明显异常。

[0107] 阴道分泌物pH值测定:在格氏乳杆菌RD-0046植入后,大部分实验组动物阴道分泌物pH值明显低于上市品对照组,且相对于植入前明显下降,pH值测定结果如表4所示。

[0108] 表4格氏乳酸杆菌RD-0046对实验动物阴道分泌物pH影响试验结果

[0109]

动物编号	组别	处理前	停 RD-0046 后第1天	停 RD-0046 后第8天	停 RD-0046 后第15 天	停 RD-0046 后第22 天	停 RD-0046 后第29 天
Y17-5021	对照组	6.8	5.5	5.7	5.9	6.2	6.4
Y17-5022	对照组	6.4	5.3	5.9	6.1	6.1	6.3
Y17-6051	实验组	7.0	5.1	4.7	4.6	4.8	4.7
Y17-6052	实验组	7.1	5.0	4.8	4.9	4.9	5.0

[0110] 阴道分泌物清洁度:植入前后相比,对照组阴道杂菌数量明显增加,清洁度降低;而实验组在格氏乳杆菌RD-0046植入后,阴道分泌物清洁度明显优于对照组,可见到数量不等的革兰氏阳性阴道杆菌,清洁度明显高于对照组。阴道分泌物清洁度判定结果如表5所示。

[0111] 表5格氏乳酸杆菌RD-0046对实验动物阴道分泌物清洁度影响试验结果

[0112]

动物编号	组别	处理前	停 RD-0046 后第1天	停 RD-0046 后第8天	停 RD-0046 后第15 天	停 RD-0046 后第22 天	停 RD-0046 后第29 天
Y17-5021	对照组	II	II	II	III	III	III
Y17-5022	对照组	I	I	II	II	III	III
Y17-6051	实验组	II	I	I	II	II	II
Y17-6052	实验组	I	I	I	II	II	II

[0113]

Y17-5021	对照组	II	II	II	III	III	III
Y17-5022	对照组	I	I	II	II	III	III
Y17-6051	实验组	II	I	I	II	II	II
Y17-6052	实验组	I	I	I	II	II	II

[0114] I~III为清洁程度,III表示洁净度最低。

[0115] 将实验组分泌物进行扩增分离纯化,经过阴道菌群分析,从实验组全部3只动物阴

道分泌物中均发现供试格氏乳杆菌RD-0046,分离出的供试格氏乳杆菌RD-0046的信息如图10所示。从图中可看出,受试动物阴道分泌物中均发现供试格氏乳杆菌RD-0046,因此可以看出格氏乳杆菌RD-0046可以有效定植于中华食蟹猴阴道内。

[0116] 实施例8(格氏乳杆菌RD-0046冻干保存及冻干粉稳定性)

[0117] 为了检测格氏乳杆菌RD-0046在发酵和冻干情况下的存活率,将格氏乳杆菌RD-0046在pH 6.5的改良MRS培养基中生长,使用100升规模的发酵罐发酵。在平台期早期收集菌体,其活菌数达到约 3×10^9 CFU/ml。通过离心分离收集菌体,用磷酸缓冲液洗涤后,与冻干保护剂(包括脱脂奶粉和蔗糖等)混合。然后,将混合物置于冷冻干燥机中冷冻干燥。样品在 -40°C 下冷冻约2小时,然后在 -20°C 下真空干燥20-30小时,再在 30°C 干燥3-5小时。干粉在放入干燥剂的铝箔袋分装,并存储在 4°C 和室温(25°C)。在第0、1、2、3、6、12月通过平板计数测定活菌数。

[0118] 初始的格氏乳杆菌RD-0046每克干粉含有高达750亿活菌(7.5×10^{10} cfu/g),在 $2-8^\circ\text{C}$ 下具有最佳的储存稳定性。 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存6个月后,保留初始活菌数的77.3%,见表6。

[0119] 表6格氏乳酸杆菌RD-0046冻干粉菌剂稳定性试验结果

[0120]

条件	总菌数/克干粉	活菌率/%
0个月	7.5×10^{10}	/
3个月, $2-8^\circ\text{C}$	5.8×10^{10}	77.3%
3个月, 25°C	2.3×10^{10}	30.7%
6个月, $2-8^\circ\text{C}$	4.7×10^{10}	62.7%

[0121]

条件	总菌数/克干粉	活菌率/%
6个月, 25°C	1.4×10^{10}	18.6%

[0122] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、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> 赵湘江

<120> 一种鼠李糖乳杆菌及其用于制备阴道抑菌药物的应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1506

<212> DNA

<213> 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)

<400> 1

```

aatttttgtc caccttagac ggetcgetcc ctaaaagggt tacgccaccg gcttcgggtg 60
ttacaaactc tcatgggtgt acgggceggtg tgtacaagge cggggaactg attcaccgcg 120
gcgtgctgat ccgcgattac tagcgattcc gaattcgtgt aggcgagttg cagcctacag 180
tccgaactga gaatggcttt aagagattag cttgacctcg cggctctgca actcgttgta 240
ccatccattg tagcacgtgt gtagcccagg tcataagggg catgatgatt tgacgtcacc 300
cccaccttcc tccggtttgt caccggcagt cttactagag tgcccacta aatgctggca 360
actagtcata agggttgcgc tcggttcggg acttaacca acatctcag acacgagctg 420
acgacaacca tgcaccacct gtcattttgc ccccgaaggg gaaacctgat ctctcaggtg 480
atcaaaagat gtcaagacct ggtaaggttc ttcgcgttgc ttcgaattaa accacatgct 540
ccaccgcttg tgcgggcccc cgtaattcc tttgagtttc aacettgceg tegtactccc 600
caggcggaat gcttaatgcg ttagctgcgg cactgaaggg cggaaacct ccaacaccta 660
gcattcatcg tttacggcat ggactaccag ggtatctaat cctgttctgct acccatgctt 720
tcgagcctca gcgtcagtta cagaccagac agecgecttc gccactggtg ttcttccata 780
tatctacgca tttcaccgct acacatggag ttccactgtc ctcttctgca ctcaagtttc 840
ccagtttccg atgcacttcc tcggttaagc cgagggcttt cacatcagac ttaaaaaacc 900
gcctgcgctc gctttacgcc caataaatcc ggataacgct tgccacctac gtattaccgc 960
ggctgctggc acgtagttag ccgtggcttt ctggttggat accgtcacgc cgacaacagt 1020
tactctgccg accattcttc tccaacaaca gatttttacg acccgaaagc cttcttact 1080
cacgcggcgt tgctccatca gacttgcgtc cattgtggaa gattccctac tgctgcctcc 1140
cgtaggagtt tgggccgtgt ctcagtccca atgtggccga teaacctctc agttcggcta 1200
cgtatcattg ccttggtgag ccgttacctc accaactage taatacgccg cgggtccatc 1260
caaaagcgat agcttacgcc atctttcagc caagaacct gcggttcttg gatttatgcg 1320
gtattagcat ctgtttccaa atgttatecc ccaettaagg gcaggttacc cacgtgttac 1380
tcaccgctcc gccactcgtt caaaattaaa tcaagatgca agcaccttc aataatcaga 1440
actcgttcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcgtt catctgacc agaaaaaaaa 1500
actcat 1506

```

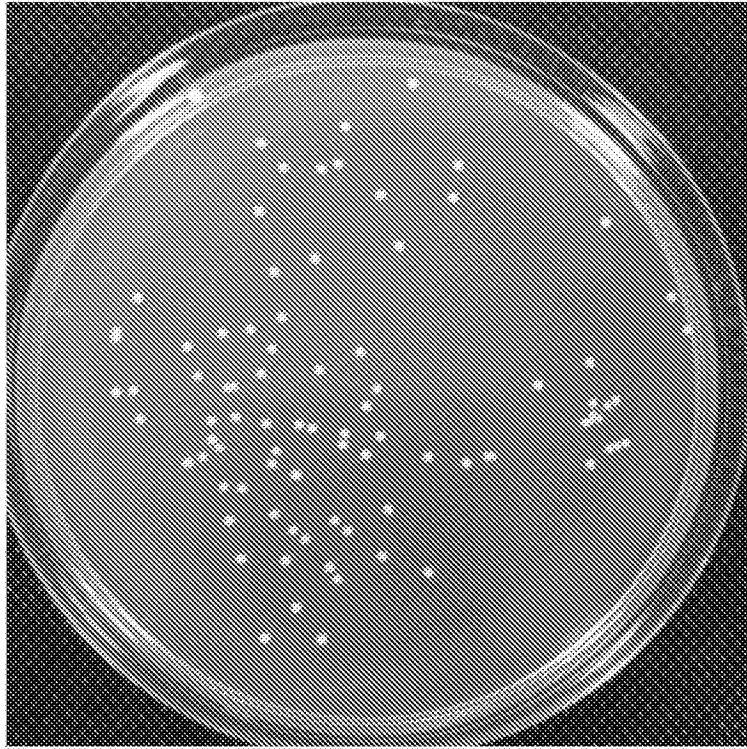


图1

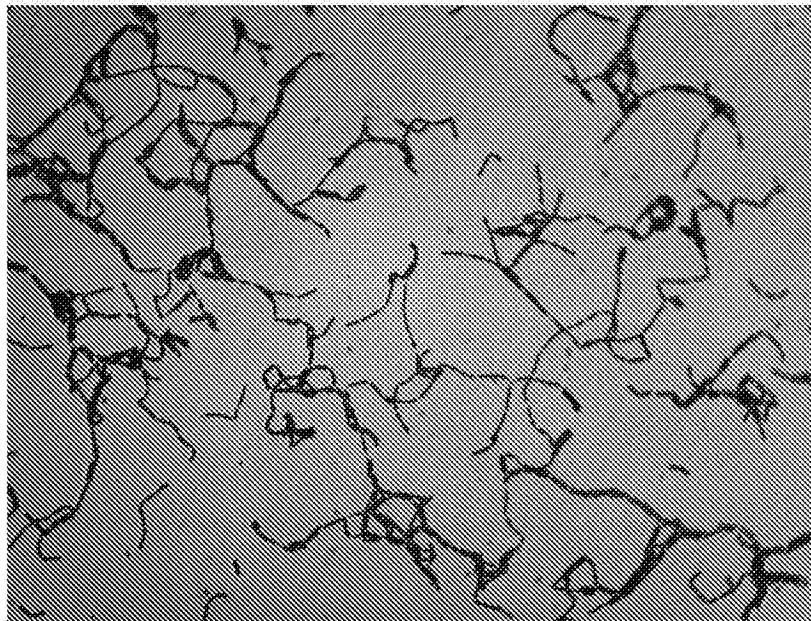


图2

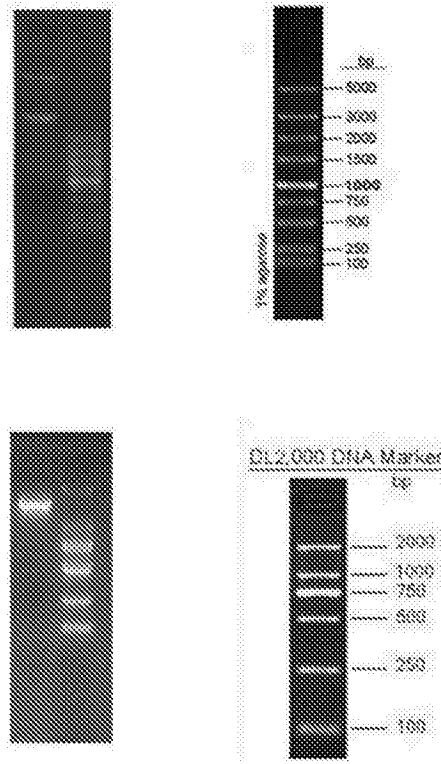


图3

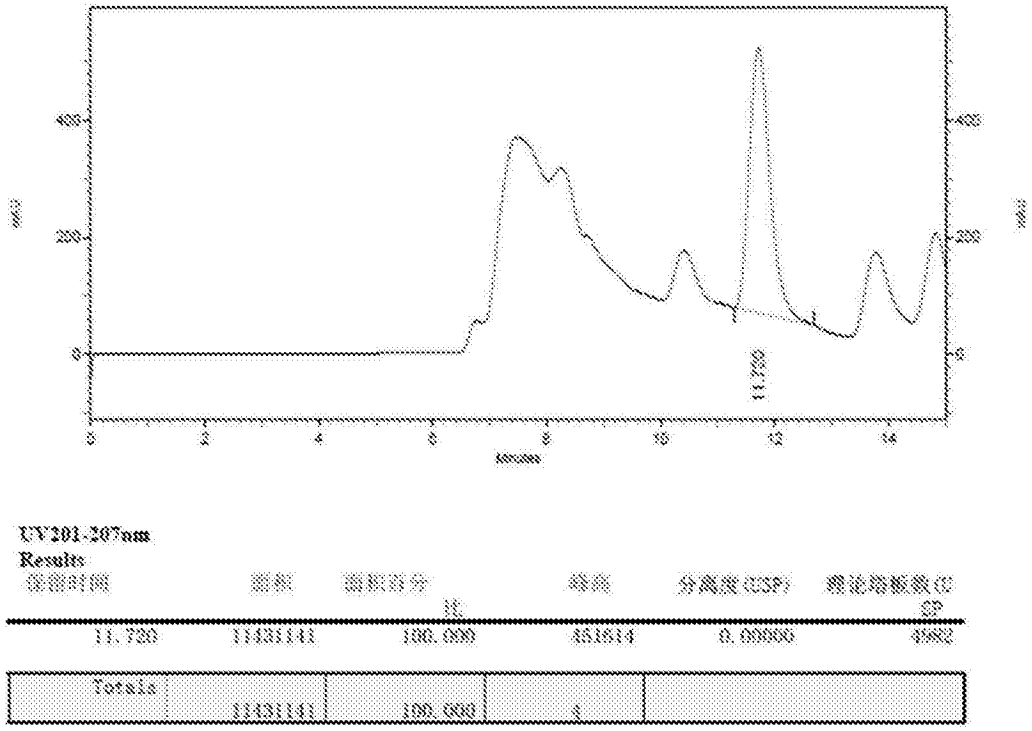


图4

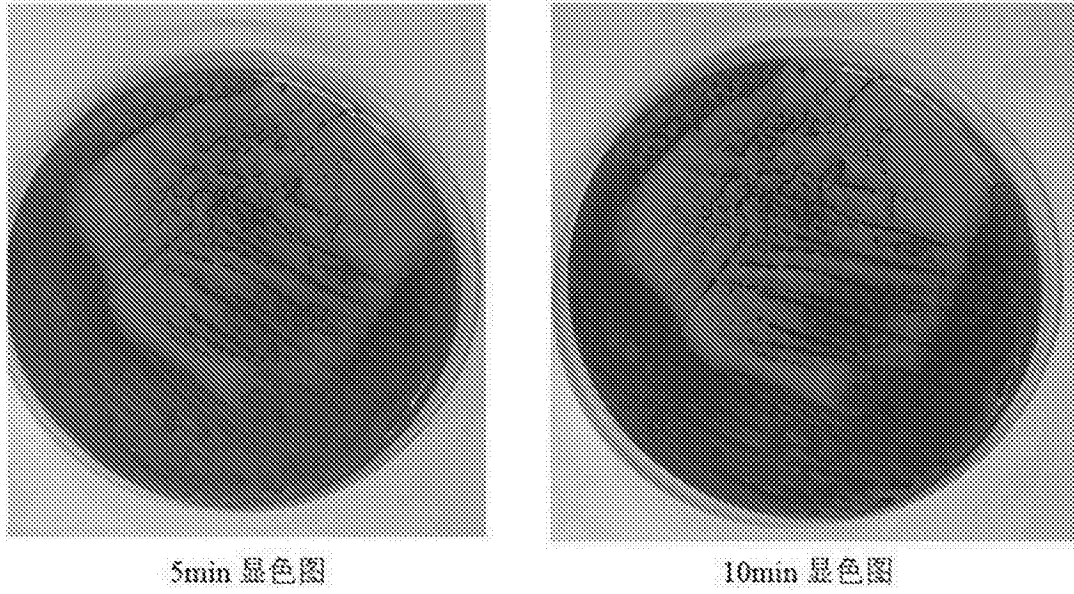


图5

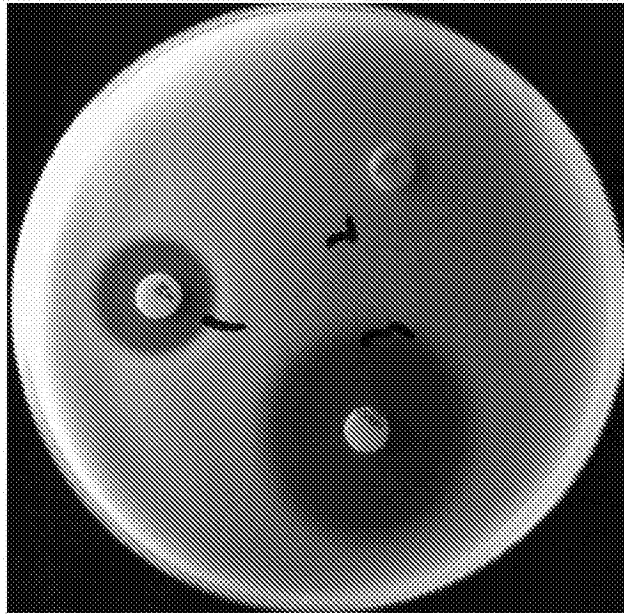


图6

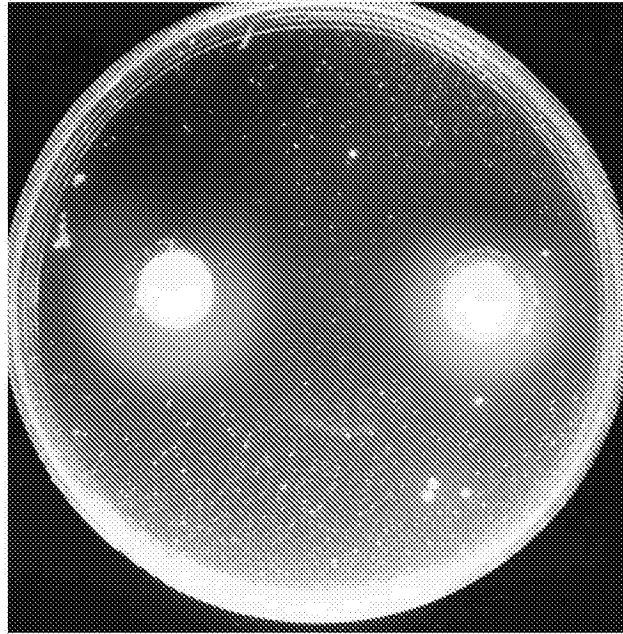


图7

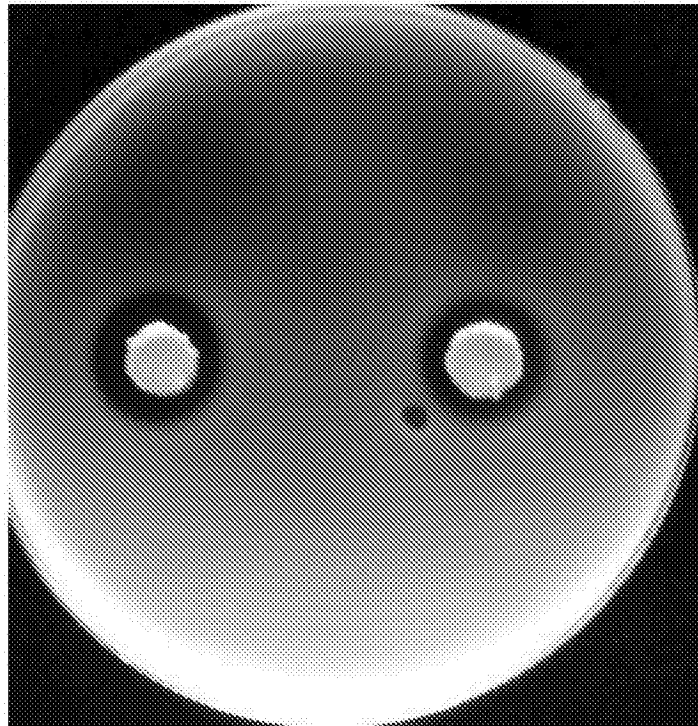


图8

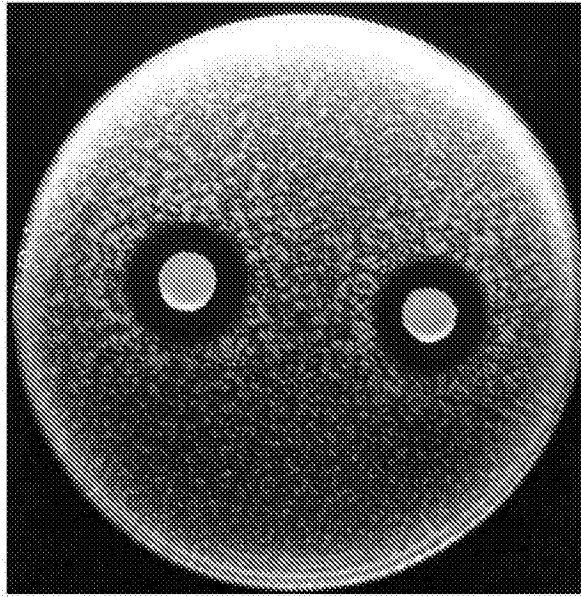


图9

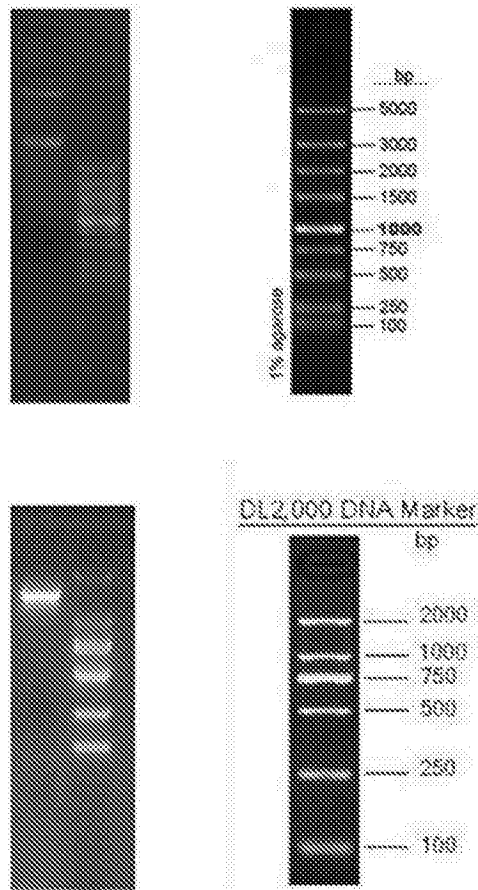


图10

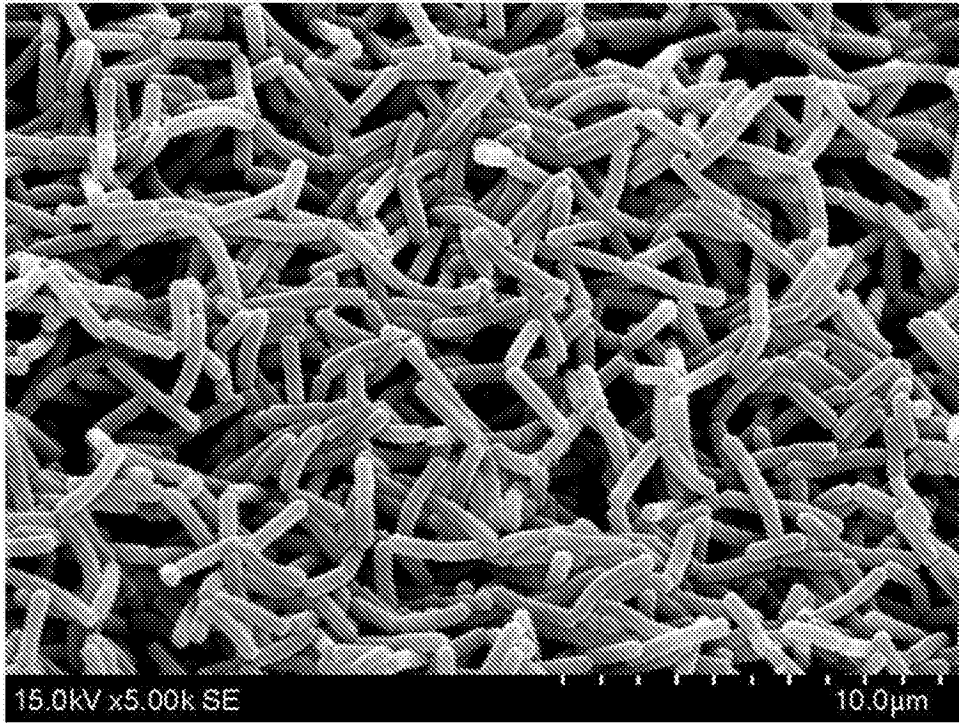


图11