



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111961616 A

(43) 申请公布日 2020.11.20

(21) 申请号 202010814932.5 *A61K 35/741* (2015.01)
(22) 申请日 2020.08.13 *A61P 37/08* (2006.01)
(83) 生物保藏信息 *A61P 11/06* (2006.01)
CCTCC NO:M 2020105 2020.04.30 *A61P 29/00* (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
(71) 申请人 浙江工商大学
地址 310012 浙江省杭州市西湖区教工路
149号
(72) 发明人 王彦波 傅玲琳 王翀 王方婷
周瑾茹 李欢
(74) 专利代理机构 厦门创象知识产权代理有限
公司 35232
代理人 王凤玲 尤怀成
(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图18页

(54) 发明名称
多形拟杆菌及其用途

(57) 摘要

本发明提出了多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 在制备预防、缓解或治疗牛奶中酪蛋白过敏的食品或者药物中的用途,所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105。该多形拟杆菌可调控Th1/Th2及Th17/Treg细胞亚群失衡,从而可缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应,缓解牛奶过敏、支气管哮喘等免疫疾病,针对性强、经济效益高、原料绿色环保无污染且副作用少。

1. 多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) 在制备预防、缓解或治疗牛奶中酪蛋白过敏的食品或者药物中的用途,所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述多形拟杆菌具有调节Th1/Th2、Th17/Treg细胞亚群失衡的作用。

3. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述多形拟杆菌摄入方式为每天 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/只小鼠。

4. 一种组合物,其特征在于,包含多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*),所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105。

5. 一种药物,其特征在于,包含多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*),所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105。

6. 如权利要求5所述的一种药物,其特征在于,还包括药学上可接受的辅剂,所述辅剂包括稳定剂、湿润剂、乳化剂、粘合剂、等渗剂的至少之一。

7. 如权利要求6所述的一种药物,其特征在于,所述药物呈片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、溶液剂、悬浮剂、冻干制剂的至少一种。

8. 一种食品,其特征在于,包含多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*),所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105。

9. 如权利要求8所述的一种食品,其特征在于,还包括食品学上可接受的添加剂。

多形拟杆菌及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物学领域,具体涉及一种多形拟杆菌及其用途。

背景技术

[0002] 牛奶含有丰富的营养物质,包括30多种蛋白,为酪蛋白和乳清蛋白。目前普遍认为酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白是主要过敏原。

[0003] 对大多数婴幼儿而言,由于生长发育初期需要补充大量的营养,牛奶就成为了营养摄入的第一选择。但是在3岁以下的儿童中牛奶过敏反应达到25%,其中酪蛋白是牛奶中存在的主要过敏原,约占牛奶总蛋白含量的80%。相关技术中,为避免牛奶过敏,部分使用代替牛奶营养的奶代替物配方;部分对酪蛋白和乳清进行水解。但其均无法从根源解决牛奶过敏的问题。

发明内容

[0004] 本申请是基于发明人对以下事实和问题的发现和认识作出的:

[0005] 针对小鼠的研究表明,血浆中抗原特异性IgG1和IgG4水平的提高以及粪便中SIgA水平的提高,可抑制过敏原特异性IgE合成并可减轻Th2介导的过敏症状;Treg具有抗炎和维持自身免疫耐受作用;Th17通过分泌细胞因子(IL-17A、IL-23)等发挥致炎效应并具有很强的促炎症作用。在过敏状态下,树突状细胞(DC)活化后分泌IL-35与TGF- β 共同促进初始细胞分化为Th17细胞诱导前炎症反应而抑制细胞Treg的活性。另一方面,辅助性T细胞Th1和Th2亚群平衡介导了过敏反应强度。所以当肠上皮细胞受损、肠道发生炎症时,会增加抗原的渗透,肠上皮细胞就会释放TSLP、IL-33和IL-25,从而促进Th2反应,诱发食物过敏;而Th2细胞主要分泌IL-5、IL-13和IL-4等因子,在速发型超敏反应中起重要作用。同时Th1细胞主要分泌IFN- γ 、IL-2和TNF- α 等介导细胞免疫和迟发性超敏反应。Th1和Th2分泌的细胞因子均可促进本亚型而抑制另一亚型的生长和分化。因此Th1/Th2、Th17/Treg平衡在维持机体自身免疫稳态中发挥重要作用,一旦此平衡被打破,将可能引起异常的免疫应答,如食物过敏、过敏性哮喘、HIV等。研究牛奶的过敏机制可知,牛奶中的酪蛋白能够引起易感人群体内Th1/Th2、Th17/Treg平衡紊乱,从而导致牛奶过敏的发生。而在本申请中,该多形拟杆菌开展功能验证实验后惊喜地发现,多形拟杆菌具有调控Th1/Th2及Th17/Treg细胞亚群失衡的作用,从而可缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应。

[0006] 为此,在本发明的第一方面,本发明提出了多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)在制备预防、缓解或治疗牛奶中酪蛋白过敏的食品或者药物中的用途,所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC M 2020105,分类命名为:多形拟杆菌WF-1198-1-2*Bacteroides thetaiotaomicron*,保藏地址为:中国.武汉.武汉大学。根据本发明的多形拟杆菌能够显著降低酪蛋白引起的过敏反应指标特异性抗体IgE、IgG1、IgG4、SIgA和血清中组胺的含量,以及降低小肠中Tslp、I133基因相对表达量和修复肠黏膜损伤,同时能够增加Th1型细胞因子(IFN- γ 、IL-2、TNF- α)、

Treg细胞 (TGF- β 、IL-35) 以及降低Th2型细胞因子 (IL-5、IL-13、IL-4) 和Th17型细胞因子 (IL-6、IL-17A) 的表达, 实现了Th1/Th2、Th17/Treg细胞平衡, 缓解了过敏反应。因此, 该多形拟杆菌可用于缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应。具有相比于现有技术更好的和更安全的功能。在减缓牛奶中酪蛋白引起的过敏方面具有特别的优势。可缓解牛奶过敏、支气管哮喘等免疫疾病, 针对性强、经济效益高、原料绿色环保无污染及副作用少。

[0007] 另外, 根据本发明的实施例, 上述用途还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0008] 根据本发明的实施例, 所述多形拟杆菌具有调节Th1/Th2、Th17/Treg细胞亚群失衡的作用。

[0009] 根据本发明的实施例, 所述多形拟杆菌摄入方式为每天 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/只小鼠。

[0010] 在本发明的第二方面, 本发明提出了一种组合物。根据本发明的实施例, 所述组合物包含: 前面所述的多形拟杆菌, 所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC M 2020105, 分类命名为: 多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron*。根据本发明的多形拟杆菌可用于缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应。具有相比于现有技术更好的和更安全的功能。在减缓牛奶中酪蛋白引起的过敏方面具有特别的优势。可缓解牛奶过敏、支气管哮喘等免疫疾病, 针对性强、经济效益高、原料绿色环保无污染及副作用少。

[0011] 在本发明的第三方面, 本发明提出了一种药物。根据本发明的实施例, 所述药物包含: 前面所述的多形拟杆菌, 所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC M 2020105, 分类命名为: 多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron*。根据本发明的多形拟杆菌可用于缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应。具有相比于现有技术更好的和更安全的功能。在减缓牛奶中酪蛋白引起的过敏方面具有特别的优势。可缓解牛奶过敏、支气管哮喘等免疫疾病, 针对性强、经济效益高、原料绿色环保无污染及副作用少。

[0012] 根据本发明的实施例, 还包括药学上可接受的辅剂, 所述辅剂包括稳定剂、湿润剂、乳化剂、粘合剂、等渗剂的至少之一。

[0013] 根据本发明的实施例, 所述药物呈片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂、溶液剂、悬浮剂、冻干制剂的至少一种。进而, 根据本发明实施例的药物方便给药, 适于保持多形拟杆菌的最佳活性。

[0014] 根据本发明的实施例, 所述药物的给药剂量不受特别限制, 实际应用中, 可以根据给药对象的健康状况灵活选择。根据本发明的一些实施例, 将所述药物以每天 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ cfu/只小鼠的剂量对致敏小鼠进行干预, 被干预小鼠的炎症得到明显缓解。

[0015] 在本发明的第四方面, 本发明提出了一种食品。根据本发明的实施例, 所述食品包含: 前面所述的多形拟杆菌, 所述多形拟杆菌于2020年4月30日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为CCTCC M 2020105, 分类命名为: 多形拟杆菌 *Bacteroides thetaiotaomicron*。根据本发明实施例的食品可缓解牛奶过敏、支气管哮喘等免疫疾病, 针对性强、经济效益高、原料绿色环保无污染及副作用少。

[0016] 需要说明的是, 本申请所述的食物应做广义的理解, 任何可咀嚼、吞咽或能为机体

提供能量的物质均可视为食品。

[0017] 根据本发明的实施例,所述食品进一步包括:食品学上可接受的添加剂。进而所述食品的口感更佳。

[0018] 另外,需要说明的是,本发明的多形拟杆菌可以与通常的食品中所使用的食品材料配合食用。例如,谷类及薯类:谷类包括米、面、杂粮,薯类包括马铃薯、红薯等;动物性食物,包括肉、禽、鱼、奶、蛋类等。

[0019] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0020] 图1为根据本发明实施例1的多形拟杆菌在光学显微镜下的结构图;

[0021] 图2为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠体重增长率的影响;

[0022] 图3为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠过敏症状的影响;

[0023] 图4为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠血清中IgE的影响;

[0024] 图5为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠血清中IgG1的影响;

[0025] 图6为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠血清中IgG4的影响;

[0026] 图7为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠血清中组胺的影响;

[0027] 图8为根据本发明实施例2的多形拟杆菌对小鼠粪便中SIgA的影响;

[0028] 图9为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠体重增长率的影响;

[0029] 图10为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠过敏症状的影响;

[0030] 图11为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠血清中IgE的影响;

[0031] 图12为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠血清中IgG1的影响;

[0032] 图13为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠血清中IgG4的影响;

[0033] 图14为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠血清中组胺的影响;

[0034] 图15为根据本发明实施例3的多形拟杆菌对小鼠粪便中SIgA的影响;

[0035] 图16为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子TNF- α 的影响;

[0036] 图17为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子IL-23的影响;

[0037] 图18为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子TGF- β 的影响;

[0038] 图19为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠肠道内Tslp mRNA表达量的影响;

[0039] 图20为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠肠道内I133 mRNA表达量的影响;

[0040] 图21为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠肠道内IL-4mRNA表达量的影响;

[0041] 图22为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠肠道内IL-17AmRNA表达量的影响;

[0042] 图23为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠十二指肠的影响;

[0043] 图24为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠空肠的影响;

[0044] 图25为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠回肠的影响;

[0045] 图26为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠结肠的影响;

[0046] 图27为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对不同免疫组织中Th细胞亚群细胞分化的影响;

- [0047] 图28为根据本发明实施例4的多形拟杆菌对小鼠不同免疫组织中Th细胞亚群细胞分化的影响；
- [0048] 图29为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子TNF- α 的影响；
- [0049] 图30为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子IL-23的影响；
- [0050] 图31为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠血清中细胞因子TGF- β 的影响；
- [0051] 图32为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠肠道内Tslp mRNA表达量的影响；
- [0052] 图33为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠肠道内I133 mRNA表达量的影响；
- [0053] 图34为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠肠道内IL-4mRNA表达量的影响；
- [0054] 图35为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠肠道内IL-17AmRNA表达量的影响；
- [0055] 图36为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠十二指肠的影响；
- [0056] 图37为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠空肠的影响；
- [0057] 图38为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠回肠的影响；
- [0058] 图39为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠结肠的影响；
- [0059] 图40为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对不同免疫组织中Th细胞亚群细胞分化的影响；
- [0060] 图41为根据本发明实施例5的多形拟杆菌对小鼠不同免疫组织中Th细胞亚群细胞分化的影响。

具体实施方式

[0061] 以下通过特定的具体实例说明本发明的技术方案。应理解，本发明提到的一个或多个方法步骤并不排斥在所述组合步骤前后还存在其他方法步骤或在这些明确提到的步骤之间还可以插入其他方法步骤；还应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。而且，除非另有说明，各方法步骤的编号仅为鉴别各方法步骤的便利工具，而非为限制各方法步骤的排列次序或限定本发明可实施的范围，其相对关系的改变或调整，在无实质变更技术内容的前提下，当亦视为本发明可实施的范畴。

[0062] 为了更好的理解上述技术方案，下面更详细地描述本发明的示例性实施例。虽然显示了本发明的示例性实施例，然而应当理解，可以以各种形式实现本发明而不被这里阐述的实施例所限制。相反，提供这些实施例是为了能够更透彻地理解本发明，并且能够将本发明的范围完整的传达给本领域的技术人员。

[0063] 下面参考具体实施例，对本发明进行描述，需要说明的是，这些实施例仅仅是描述性的，而不以任何方式限制本发明。

[0064] 实施例1菌株的分离与鉴定

[0065] 一、菌株的分离

[0066] (1) 采集身体健康的健康人群粪便样品(以浙江工商大学部分学生为对象,针对学生的身体健康情况、生活饮食习惯、饮食卫生情况进行问卷,采集身体健康,1年以上不服用药物的健康学生的粪便样品),用无菌EP管保存新鲜粪便,4℃冷藏,在4小时之内运送至实验室,完成样品处理和培养。以无菌玻璃棒将粪便样品捣碎,震荡均匀,用无菌生理盐水按十倍稀释法将样品稀释,取 10^{-3} - 10^{-8} 稀释度溶液倒入已经凝固的选择性GAM(Gifu

anaerobic medium) 肉汤培养基上,涂布均匀,放入厌氧培养箱中,37℃厌氧培养48小时。

[0067] (2) 将步骤(1)获得的菌种进行初筛,根据菌落形状、革兰氏染色以及显微镜观察得到初步的多形拟杆菌菌种。

[0068] (3) 将步骤(2)获得菌种进行生理生化验证以及16S rDNA序列分析,得到多形拟杆菌,命名为WF-1198-1-2。

[0069] 其中,生理生化特性:严格厌氧生长,进行耐氧实验、糖发酵试验、胆汁试验、七叶灵试验以及基质试验。结果见表1。

[0070] 表1生化鉴定结果

	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	鼠李糖	海藻糖	阿拉伯糖
	+	+	+	+	+	+
[0071]	水杨苷	靛基质	七叶灵	20%胆汁	触媒	
	-	+	+	+	+	

[0072] 注:质控试验对照,结果:“+”表示阴性、“-”表示阴性、“+-”表示多数菌株阴性,少数菌株阳性。

[0073] 其中,本例16S rDNA扩增的引物序列为:

[0074] 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG

[0075] 1492R GGTTACCTTGTTACGACTT

[0076] 表2 PCR反应体系为:

[0077]	Green Taq Mix	25u1
	ddH ₂ O	19u1
	27F	2u1
	1492R	2u1
	DNA	2u1

[0078] PCR反应条件为:95℃预变性3min,然后进入30-35个循环:95℃15sec、60℃15sec、72℃60sec/kb、循环结束后,72℃延伸5min。

[0079] 测序结果显示,WF-1198-1-2的菌株其16S rDNA测序结果为SEQ ID NO:3所示序列。

[0080] CAAAAATGCTCGGCTTACCATGCAGTCGAGGGCAGCATTTTCAGTTTGCTTGCAAACCTGGAGATGGCG ACCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTGCCGATAACTCGGGGATAGCCTTTCGAAAGAAAGATTAATAC CCGATGGTATAATCAGACCGCATGGTCTTGTTATTAAGAATTTTCGGTTATCGATGGGGATGCGTTCCATTAGGCA GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAACCTTCGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCCACATTGGAAGTACGAG ACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAGGCCTGAACCAGCCAAGTAG CGTGAAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAACTTCTTTTATATGGGAATAAAGTTTTCCACGTGTGGAATTTTGTA TGTACCATATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGA TTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGTAGGTGGACAGTTAAGTCAGTTGTGAAAAGTTTTCGGCTCAACCGTAAAATTGCA GTTGATACTGGCTGTCTTGAGTACAGTAGAGGTGGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACG AAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTCACTGGACTGCAACTGACACTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTTCGATATACAGTAAGCGGCCAAGCGAAA

GCATTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGA
GAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACGCCGGCTTAAATTGCATTTGATA。

[0081] 其中,光学显微镜下观察革兰氏染色后的多形拟杆菌,结果显示,多形拟杆菌呈杆状、两端钝圆而浓染,形态一致,具体光学显微镜照片参见附图1。

[0082] 将多形拟杆菌转接到优化的CDC厌氧血琼脂培养基进行培养,以备后续使用。鉴于上述形态特征和16S rDNA序列同源性分析结果,将上述步骤分离筛选得到的菌株鉴定为多形拟杆菌。该多形拟杆菌已于2020年4月30日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会典型培养物保藏中心(简称CCTCC,地址中国·武汉·武汉大学。),保藏登记号为CCTCC M 2020105。

[0083] 实施例2

[0084] 多形拟杆菌(WF-1198-1-2)缓解酪蛋白致敏的BALB/c小鼠

[0085] 酪蛋白(简称Casein)致敏食物过敏小鼠模型的建立:

[0086] (1)多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型的建立:15只6周龄SPF级雌性BALB/c小鼠,随机分成三组分别为空白组、致敏组、治疗组。小鼠预养一周,第七天进行口服灌胃酪蛋白(Casein)致敏,其中对照组(PBS)、致敏组Casein(200 μ g)、治疗组Casein(200 μ g)+多形拟杆菌菌悬液(1×10^8 cfu/只小鼠每天),连续两周每周三次。之后灌胃对应致敏剂量6倍的Casein进行激发,每周1次,连续2周,从第7天开始对多形拟杆菌治疗组开始灌服,试验四周。25 $^{\circ}$ C饲养,自由饮水,每周称一次体重,最后一次激发后禁食,第二天断颈处死。

[0087] (2)小鼠每周体重变化:在小鼠饲养期间,每周同一天称取小鼠体重,观察小鼠体重变化。并计算每组小鼠每周体重增长率,计算公式:

[0088] 小鼠第N周体重增长率 = $\frac{\text{第N周体重} - \text{第(N-1)周体重}}{\text{第N周体重}}$ 。

[0089] 结果如图2所示,酪蛋白致敏后小鼠体重上升趋势减缓,但多形拟杆菌干预后小鼠体重上升趋势增加并逐渐接近PBS组。

[0090] (3)小鼠腹泻及过敏症状评分评定小鼠过敏症状:每周观察小鼠过敏及腹泻情况,参照以下评分系统进行打分。

[0091] 表3小鼠腹泻及过敏症状评分表

得分	症状	腹泻
0	无任何症状;	无腹泻症状
1	小鼠反复抓挠耳朵、嘴巴; 后脚反复挠耳道	粪便颗粒状带粘液
2	小鼠活动量减少; 开始有单独活动; 耳朵、眼睛红肿; 鼻翼煽动; 厌食	粪便基本颗粒状结构消失;
[0092] 3	小鼠静止时间肠道 2 min 以上; 活动量明显减少; 呼吸速率增加; 毛发竖立;	粪便不成形, 夹带大量的黄色粘液;
4	眼球突出; 结膜充血; 刺激后无反应; 颤抖; 惊厥	粪便不成形, 液体状, 肛门部位有轻微粪便残留;
5	死亡;	严重水样便, 在肛门部位结块, 堵住肛门, 不及时清理造成小鼠死亡;

[0093] 结果如图3所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组产生明显的过敏症状,但多形拟杆菌干预后小鼠过敏症状减轻。

[0094] (4) 小鼠血清中特异性IgE、IgG4、IgG1测定:利用双抗体夹心间接ELISA法检测。

[0095] 96孔板每孔包被100 μ L的10 μ g/mL纯化的Casein,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;第二天,取出包被好的96孔板,弃去包被液,每孔加入300 μ L的洗涤液(PBS+0.05%吐温20)孵育1min,弃去液体,滤纸上拍干,再次加入300 μ L的洗涤液进行洗板,重复洗板3次,避免产生气泡;每孔加入200 μ L封闭液(含BSA),37 $^{\circ}$ C孵育1h;之后同样加入300 μ L的洗涤液洗板3次;每孔加入100 μ L稀释后的小鼠血清样品(IgE 1:6,IgG4 1:200,IgG1 1:200),37 $^{\circ}$ C孵育2h;之后同样加入300 μ L的洗涤液洗板5次;每孔加入100 μ L HRP标记的二抗(Goat Anti-Mouse IgG1-HRP、Goat Anti-Mouse IgG4-HRP、Goat Anti-Mouse IgE-HRP),37 $^{\circ}$ C孵育1h;之后同样加入300 μ L的洗涤液洗板5次;每孔加入100 μ L TMB,37 $^{\circ}$ C避光孵育20min后加入50 μ L终止液(2N H₂SO₄),在450nm和570nm波长测定各孔的OD值

[0096] 结果如图4-图6所示,酪蛋白致敏组的IgE、IgG4、IgG1含量都有所上升,但多形拟杆菌干预后IgE、IgG4含量都显著下降,IgG1含量几乎无变化。

[0097] (5) 小鼠血清中组胺的测定:血清中组胺的测定采用小鼠组胺ELISA试剂盒(购于Thermo Fisher Scientific),按照其说明书进行测定,在450nm处测定各孔的吸光度OD值。

[0098] 结果如图7所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的组胺有所提升,但多形拟杆菌干预后组胺含量有所下降。

[0099] (6) 小鼠粪便中SIgA的测定:将粪便制成粪便悬液,利用双抗体夹心间接ELISA法检测,在波长450nm和570nm波长测定各孔的OD值。

[0100] 结果如图8所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的SIgA有所提升,但多形拟杆菌干预后SIgA含量显著下降。

[0101] 实施例3

[0102] 多形拟杆菌(WF-1198-1-2)缓解酪蛋白致敏的BALB/c小鼠

[0103] (1) 多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型建立:利用常规酪蛋白(Casein)致敏食物过敏小鼠模型,在致敏组基础上给予多形拟杆菌菌悬液(1×10^{11} cfu/只小鼠每天)进行灌胃

处理,建立多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型。试验四周,最后一次激发后禁食,第二天断颈处死。

[0104] (2) 小鼠每周体重变化:在小鼠饲养期间,每周同一天称取小鼠体重,观察小鼠体重变化。并计算每组小鼠每周体重增长率,计算公式:

$$[0105] \quad \text{小鼠第 } N \text{ 周体重增长率} = \frac{\text{第 } N \text{ 周体重} - \text{第 } (N-1) \text{ 周体重}}{\text{第 } N \text{ 周体重}}。$$

[0106] 结果如图9所示,酪蛋白致敏后,小鼠体重上升趋势减缓,但多形拟杆菌干预后小鼠体重上升趋势增加并逐渐接近PBS组。

[0107] (3) 小鼠腹泻及过敏症状评分评定小鼠过敏症状:每周观察小鼠过敏及腹泻情况,参照评分系统进行打分。

[0108] 结果如图10所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组产生明显的过敏症状,但多形拟杆菌干预后小鼠过敏症状减轻。

[0109] (4) 小鼠血清中特异性IgE、IgG4、IgG1测定:利用双抗体夹心间接ELISA法检测,在波长450nm和570nm波长测定各孔的OD值。

[0110] 结果如图11-图13所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的IgE、IgG4、IgG1都有所提升,但多形拟杆菌干预后IgE和IgG4的含量都有所下降,IgG1含量几乎无变化。

[0111] (5) 小鼠血清中组胺的测定:血清中组胺的测定采用小鼠组胺ELISA试剂盒,按照其说明书进行测定,在450nm处测定各孔的吸光度OD值。

[0112] 结果如图14所示,与PBS组相比,CASEIN致敏组的组胺有所提升,但多形拟杆菌干预后组胺含量有所下降。

[0113] (6) 小鼠粪便中SIgA的测定:将粪便制成粪便悬液,利用双抗体夹心间接ELISA法检测,在波长450nm和570nm波长测定各孔的OD值。

[0114] 结果如图15所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的SIgA有所提升,但多形拟杆菌干预后SIgA含量显著下降。

[0115] 实施例4

[0116] 多形拟杆菌调控Th1/Th2、Th17/Treg细胞亚群失衡:

[0117] (1) 多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型建立:利用常规酪蛋白致敏食物过敏小鼠模型,在致敏组基础上给予多形拟杆菌菌悬液(1×10^8 cfu/只小鼠每天)进行灌胃处理,建立多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型。第四周灌胃结束后观察12h,进行眼眶取血处死,血液凝固后离心取上清,分装冻存于 -20°C 。

[0118] (2) 脾脏单细胞悬液制备:200目筛置于一次性无菌培养皿上,用高温灭菌过的手术剪小心取出小鼠脾脏置于200目筛中,倒入5mL无菌PBS,用一次性10mL注射器芯轻轻研磨,移液器移取充分研磨后的脾细胞悬液至无菌15mL离心管中, 4°C 300g离心5min取沉淀,沉淀重悬于5mL红细胞裂解液中,混匀,室温孵育5min, 4°C 300g离心5min取沉淀,沉淀重悬于5mLPBS溶液中洗涤两次,室温孵育5min, 4°C 300g离心5min取沉淀,最后一次离心完毕加适量RPMI 1640培养基制成脾脏单细胞悬液至细胞浓度为 1×10^4 个/mL。

[0119] (3) 小鼠血清中细胞因子IL-23、TNF- α 、TGF- β 分泌量的测定:采用Bio-Plex检测试剂盒的双抗夹心法检测小鼠血清中细胞因子的分泌量:在96孔板中分别加入50 μL 的磁珠,

室温孵育30min后用加入100 μ L洗液,洗2次;拍干后加入50 μ L样品(或标准品),在850rpm的摇床上室温孵育30min;弃去样品后用100 μ L的洗液,洗3次;拍干后,每孔加入50 μ L streptavidin-PE,在850rpm的摇床上室温孵育10min;拍干后加入洗液100 μ L,洗3次;每孔加入125 μ L Assay buffer重悬,在850rpm的摇床上室温孵育30sec;上机检测。

[0120] 结果如图16-图18所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的IL-23、TNF- α 、TGF- β 含量都有所上升,但多形拟杆菌干预后IL-23、TNF- α 、TGF- β 含量都显著下降。

[0121] (4) 小鼠肠道内Tslp、Il33、IL-17A、IL-4 mRNA表达量的测定:利用q-PCR测定小鼠大肠和小肠内基因mRNA的表达量:取肠道组织于研钵中用液氮研磨成并用TRIzol提取RNA。利用HiScript[®] II qRT Super进行反转录得到cDNA。实时荧光定量PCR按照SYBR Green I kit or SYBR Green FastStart kit进行配制。利用HRPT作为mRNA表达量的内参基因进行q-PCR检测。引物设计如下

[0122] 表4实时荧光定量PCR上下游引物序列

Genes	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
Tslp	CAGCTTGTCCTCGAAAATCG	AAATGTTTTGTCGGGGAGTG
Il33	GACACATTGAGCATCCAAGG	AACAGATTGGTCATTGTATGTAC
IL-4	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
IL-17A	AGGGAGAGCTTCATCTGTGG	AGATTCATGGACCCCAACAG
β -actin	CGCAAAGACCTGTATGCCAAT	GGGCTGTGATCTCCTTCTGC

[0124] 结果如图19-图22所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的Tslp、Il33、IL-17A、IL-4含量都有所上升,但多形拟杆菌干预后Tslp、Il33、IL-17A、IL-4都显著下降。

[0125] (5) 利用苏木精-伊红染色法对小鼠肠道不同部位进行切片染色:取肠道组织不同部位(小鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠),每个肠道部位组织取约3-5cm浸泡于1mL 4%多聚甲醛中使其固定。将固定好的组织放入脱水机中,再由低浓度到高浓度乙醇作为脱水剂进行脱水,然后将组织置于二甲苯中,使组织透明;再将透明组织放入包埋机进行包埋;之后将组织放入切片机中,切为厚度为4 μ m的切片;然后将切片置于60 $^{\circ}$ C烤箱中烘烤2h;之后用二甲苯I、二甲苯II各浸泡15min;再经无水乙醇I、II各浸泡10min;再经由95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各浸泡2min;再用自来水冲洗1min即可染色;将切片放入苏木素染液中染5min,之后用流水冲洗2min;接着用0.5%盐酸酒精分化5s,并用流水冲洗1min;再用0.5%稀氨水返蓝20s,并用流水冲洗3min;再将切片放入0.5%伊红染液染色2min,并用流水冲洗1min;再将切片放入80%乙醇、95%乙醇各30s;再用无水乙醇I、II各2min;之后用二甲苯I、二甲苯II各5min,使切片透明;在已透明的切片上滴上中性树脂胶封固;用显微镜观察。

[0126] 结果如图23-图26所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的十二指肠、空肠、回肠与结肠损伤严重,但多形拟杆菌干预组的十二指肠、空肠、回肠与结肠肠损伤较于酪蛋白致敏组有所减缓。

[0127] (6) 流式细胞术检测小鼠脾脏中T细胞分化:取小鼠脾脏制成单细胞悬液并取1mL加到12孔板中,每个孔中加入2 μ L胞内指标刺激阻断试剂(Leukocyte Activation Cocktail),混合均匀后,将其放入37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱中培养5h;收集细胞,4 $^{\circ}$ C, 500 \times g,离心5min,用1mL PBS溶液洗涤两次;250 \times g离心10min,弃上清,细胞沉淀中加入1mL BD

Cytofix™缓冲液重悬细胞,并孵育10-20min;以250×g离心10min,弃上清后,加入1mLPBS溶液洗涤两次,再250×g离心10min;在细胞沉淀中加入1mL1×BD Perm/Wash™缓冲液以重悬细胞,并孵育15min;然后在以250×g离心细胞10min,弃去上清液;用50μL1×BD Perm/Wash™缓冲液重悬细胞,避光孵育30min;染色后用1mL1×BD Perm/Wash™缓冲液洗涤细胞两次,并重悬于200μL PBS溶液中,然后上流式细胞仪进行检测。

[0128] 结果如图27和图28所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的IL-4含量有所上升,但多形拟杆菌干预后IL-4含量显著下降。

[0129] 实施例5

[0130] 多形拟杆菌调控Th1/Th2、Th17/Treg细胞亚群失衡:

[0131] (1) 多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型建立:利用常规酪蛋白致敏食物过敏小鼠模型,在致敏组基础上给予多形拟杆菌菌悬液(1×10^{11} cfu/只小鼠每天)进行灌胃处理,建立多形拟杆菌干预食物过敏小鼠模型。第四周灌胃结束后观察12h,进行眼眶取血处死,血液凝固后离心取上清,分装冻存于-20℃。

[0132] (2) 脾脏单细胞悬液制备:200目筛置于一次性无菌培养皿上,用高温灭菌过的手术剪小心取出小鼠脾脏置于200目筛中,倒入5mL无菌PBS,用一次性10mL注射器芯轻轻研磨,移液器移取充分研磨后的脾细胞悬液至无菌15mL离心管中,4℃300g离心5min取沉淀,沉淀重悬于5mL红细胞裂解液中,混匀,室温孵育5min,4℃300g离心5min取沉淀,沉淀重悬于5mLPBS溶液中洗涤两次,室温孵育5min,4℃300g离心5min取沉淀,最后一次离心完毕加适量RPMI 1640培养基制成脾脏单细胞悬液至细胞浓度为 1×10^4 个/mL。

[0133] (3) 小鼠血清中细胞因子IL-23、TNF-α、TGF-β分泌量的测定:采用Bio-Plex检测试剂盒的双抗夹心法检测小鼠血清中细胞因子的分泌量:在96孔板中分别加入50μL的磁珠,室温孵育30min后用加入100μL洗液,洗2次;拍干后加入50μL样品(或标准品),在850rpm的摇床上室温孵育30min;弃去样品后用100μL的洗液,洗3次;拍干后,每孔加入50μL streptavidin-PE,在850rpm的摇床上室温孵育10min;拍干后加入洗液100μL,洗3次;每孔加入125μL assay buffer重悬,在850rpm的摇床上室温孵育30sec;上机检测。

[0134] 结果如图29-图31所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的IL-23、TNF-α、TGF-β含量都有所上升,但多形拟杆菌干预后IL-23、TNF-α、TGF-β含量都显著下降。

[0135] (4) 小鼠肠道内Tslp、I133、IL-17A、IL-4 mRNA表达量的测定:利用q-PCR测定小鼠大肠和小肠内基因mRNA的表达量:取肠道组织于研钵中用液氮研磨成并用TRIzol提取RNA。利用HiScript® II qRT Super进行反转录得到cDNA。实时荧光定量PCR按照SYBR Green I kit or SYBR Green FastStart kit进行配制。利用HRPT作为mRNA表达量的内参基因进行q-PCR检测。

[0136] 结果如图32-图35所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的Tslp、I133、IL-17A、IL-4含量都有所上升,但多形拟杆菌干预后Tslp、I133、IL-17A、IL-4都显著下降。

[0137] (5) 利用苏木精-伊红染色法对小鼠肠道不同部位进行切片染色:取肠道组织不同部位(小鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠),每个肠道部位组织取约3-5cm浸泡于1mL 4%多聚甲醛中使其固定。将固定好的组织放入脱水机中,再由低浓度到高浓度乙醇作为脱水剂进行脱水,然后将组织置于二甲苯中,使组织透明;再将透明组织放入包埋机进行包埋;之后将组织放入切片机中,切为厚度为4μm的切片;然后将切片置于60℃烤箱中烘烤2h;之

后用二甲苯I、二甲苯II各浸泡15min;再经无水乙醇I、II各浸泡10min;再经由95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇各浸泡2min;再用自来水冲洗1min即可染色;将切片放入苏木素染液中染5min,之后用流水冲洗2min;接着用0.5%盐酸酒精分化5s,并用流水冲洗1min;再用0.5%稀氨水返蓝20s,并用流水冲洗3min;再将切片放入0.5%伊红染液染色2min,并用流水冲洗1min;再将切片放入80%乙醇、95%乙醇各30s;再用无水乙醇I、II各2min;之后用二甲苯I、二甲苯II各5min,使切片透明;在已透明的切片上滴上中性树脂封固;用显微镜观察。

[0138] 结果如图36-图39所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的十二指肠、空肠、回肠与结肠损伤严重,但多形拟杆菌干预组的十二指肠、空肠、回肠与结肠损伤较于酪蛋白致敏组有所减缓。

[0139] (6) 流式细胞术检测小鼠脾脏中T细胞分化:取小鼠脾脏制成单细胞悬液并取1mL加到12孔板中,每个孔中加入2 μ L胞内指标刺激阻断试剂(Leukocyte Activation Cocktail),混合均匀后,将其放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中培养5h;收集细胞,4 $^{\circ}$ C,500 \times g,离心5min,用1mLPBS溶液洗涤两次;250 \times g离心10min,弃上清,细胞沉淀中加入1mL BD Cytotfix™缓冲液重悬细胞,并孵育10-20min;以250 \times g离心10min,弃上清后,加入1mLPBS溶液洗涤两次,再250 \times g离心10min;在细胞沉淀中加入1mL1 \times BD Perm/Wash™缓冲液以重悬细胞,并孵育15min;然后在以250 \times g离心细胞10min,弃去上清液;用50 μ L1 \times BD Perm/Wash™缓冲液重悬细胞,避光孵育30min;染色后用1mL1 \times BD Perm/Wash™缓冲液洗涤细胞两次,并重悬于200 μ L PBS溶液中,然后上流式细胞仪进行检测。

[0140] 结果如图40和图41所示,与PBS组相比,酪蛋白致敏组的IL-4含量有所上升,但多形拟杆菌干预后IL-4含量显著下降。

[0141] 综上,本发明的多形拟杆菌能够显著降低酪蛋白引起的过敏反应指标特异性抗体IgE、IgG1、IgG4、SIgA和血清中组胺的含量及降低小肠中Tslp、Il33基因相对表达量以及能够修复肠黏膜损伤,同时多形拟杆菌能够增加Th1型细胞因子(IL-2、TNF- α)、Treg细胞(TGF- β 、IL-35)以及降低Th2型细胞因子(IL-5、IL-13、IL-4)和Th17型细胞因子(IL-23、IL-17A)的表达,实现了Th1/Th2、Th17/Treg细胞平衡,缓解了过敏反应。因此,多形拟杆菌可用于缓解牛奶中酪蛋白引起的过敏反应。

[0142] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不应理解为必须针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例进行接合和组合。

[0143] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

序列表

<110> 浙江工商大学

<120> 多形拟杆菌及其用途

<130> 2019

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 3

<211> 968

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

caaaaatgct cggcttacca tgcagtcgag gggcagcatt tcagtttgct tgcaaactgg 60
 agatggcgac cggcgcacgg gtgagtaaca cgtatccaac ctgccgataa ctcggggata 120
 gcctttcgaa agaaagatta ataccgatg gtataatcag accgcatggt cttgttatta 180
 aagaatttcg gttatcgatg gggatgcggt ccattagca gttggtgagg taacggctca 240
 ccaaaccttc gatggatagg gtttctgaga ggaaggtccc ccacattgga actgagacac 300
 ggtccaaact cctacgggag gcagcagtga ggaatattgg tcaatgggcg caggcctgaa 360
 ccagccaagt agcgtgaagg atgactgcc tatgggttgt aaacttcttt tatatgggaa 420
 taaagttttc cacgtgtgga atttgtatg taccatatga ataaggatcg gctaactccg 480
 tgccagcagc cgcggttaata cggaggatcc gagcgttata cggatttatt gggtttaag 540
 ggagcgtagg tggacagtta agtcagttgt gaaagtttgc ggctcaaccg taaaattgca 600
 gttgatactg gctgtcttga gtacagtaga ggtgggcgga attcgtggtg tagcggtgaa 660
 atgcttagat atcacgaaga actccgattg cgaaggcagc tcaactggact gcaactgaca 720
 ctgatgctcg aaagtgtggg tatcaaacag gattagatac cctggtagtc cacacagtaa 780
 acgatgaata ctcgctgttt gcgatataca gtaagcggcc aagcgaaagc attaagtatt 840
 ccacctgggg agtacgccg cacggtgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag 900

cggagaacat gtggtttaat tcgatgatac gcgaggaacc ttacgccggg cttaaattgc 960
at ttgata 968

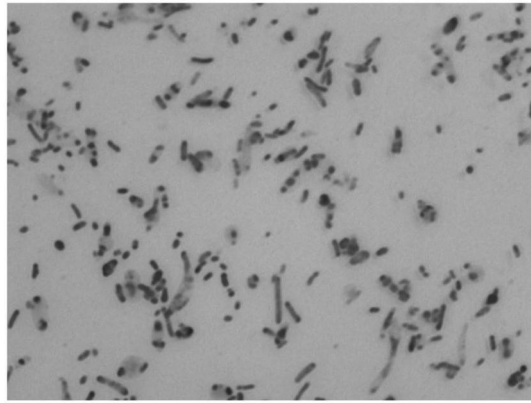


图1

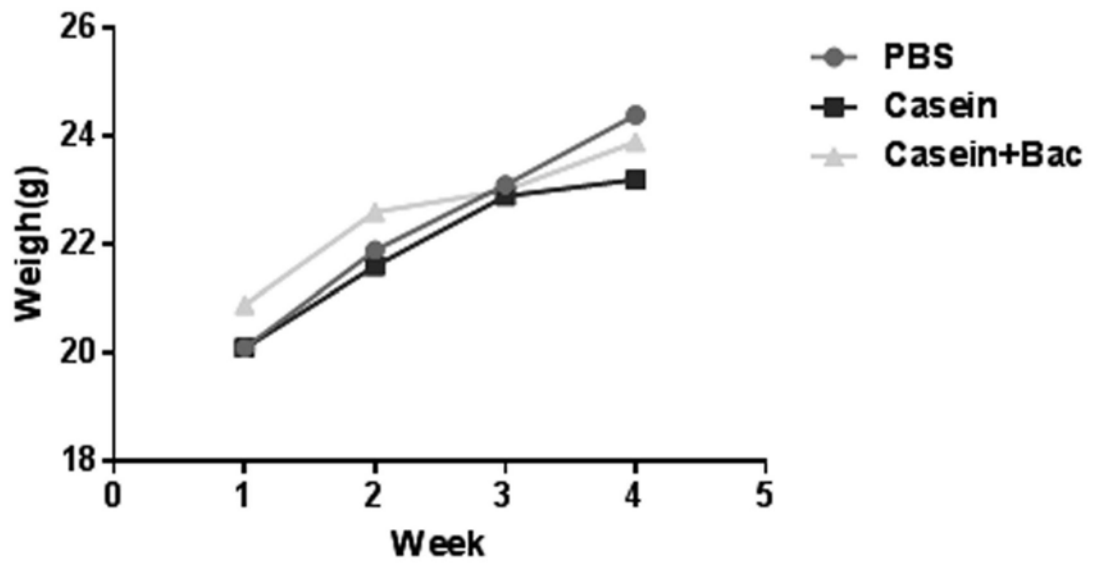


图2

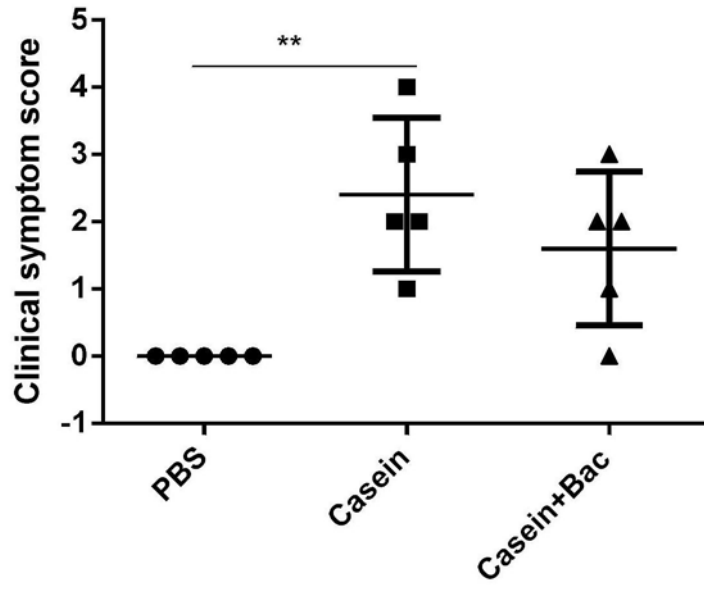


图3

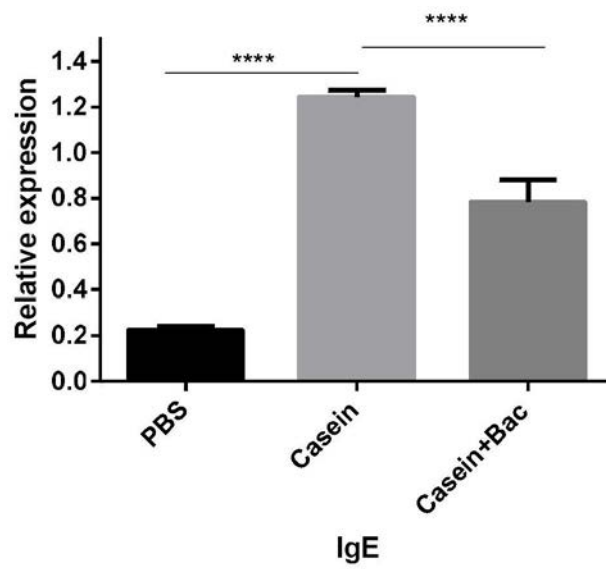


图4

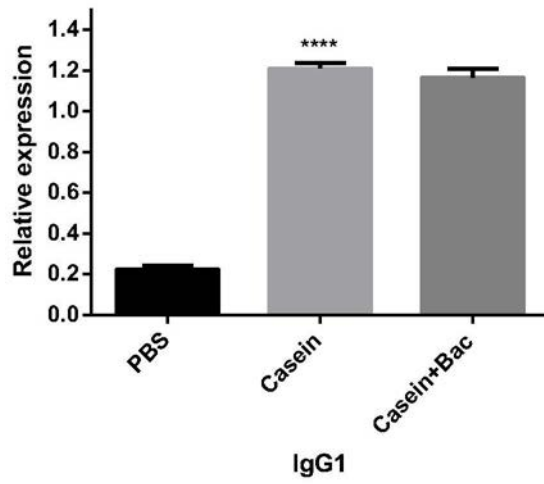


图5

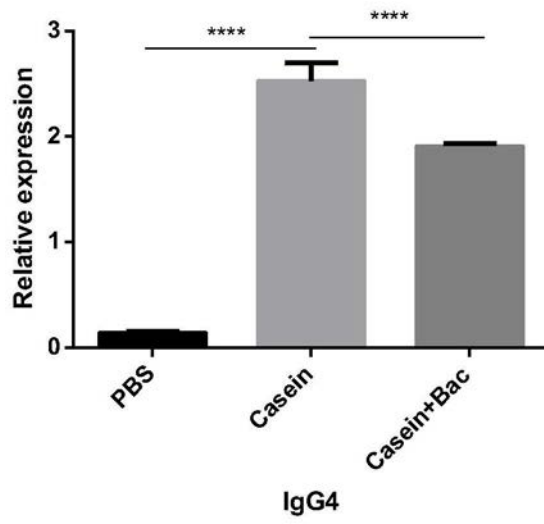


图6

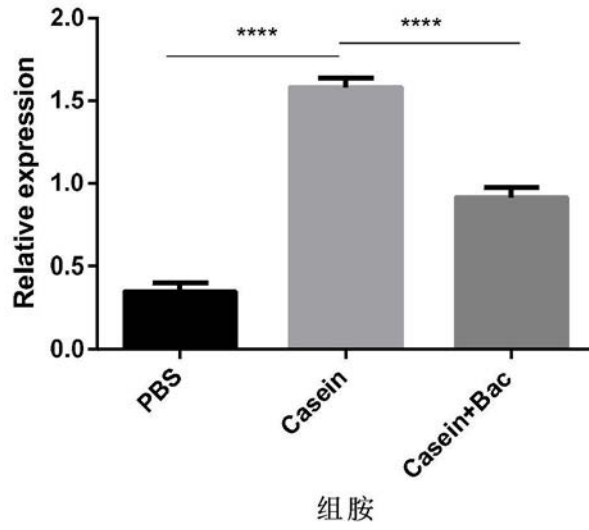


图7

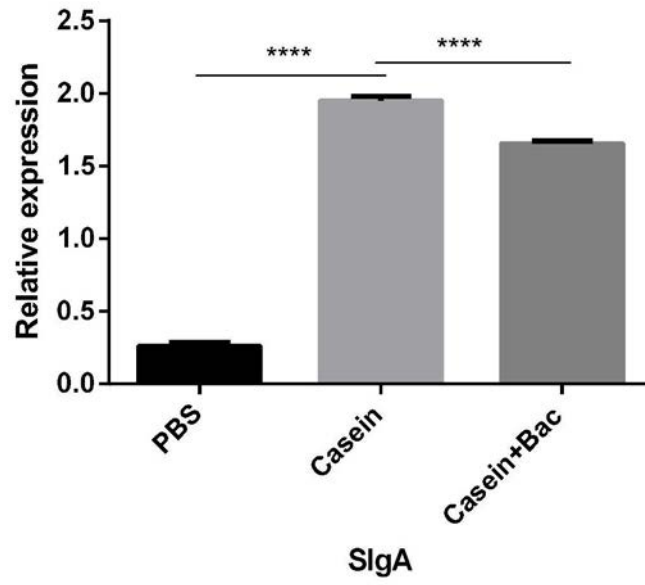


图8

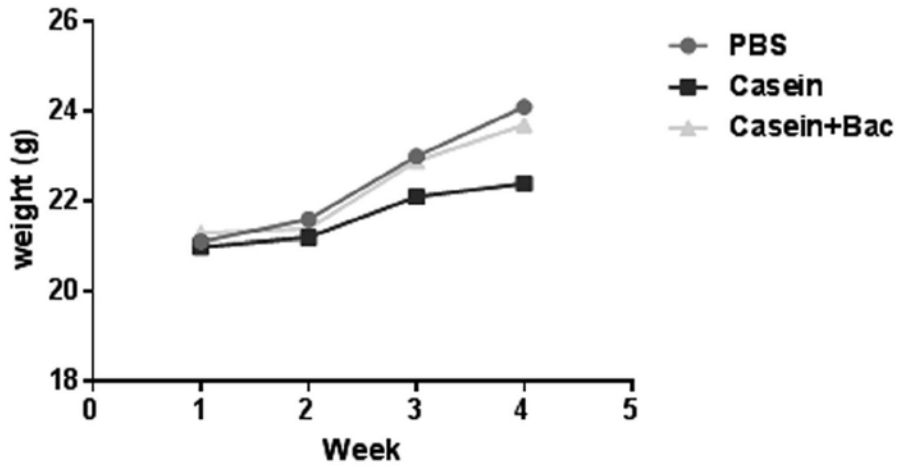


图9

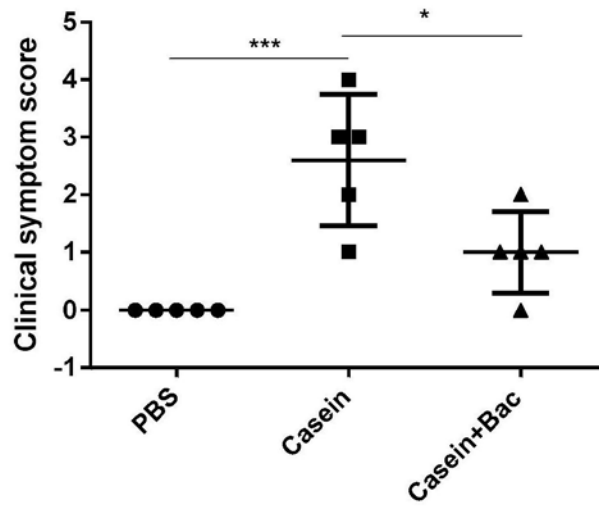


图10

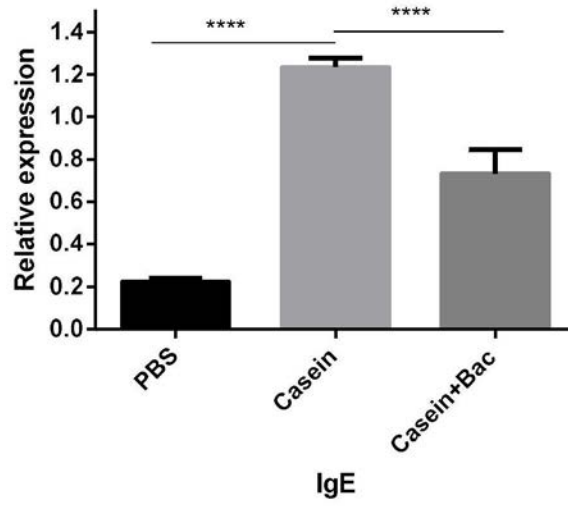


图11

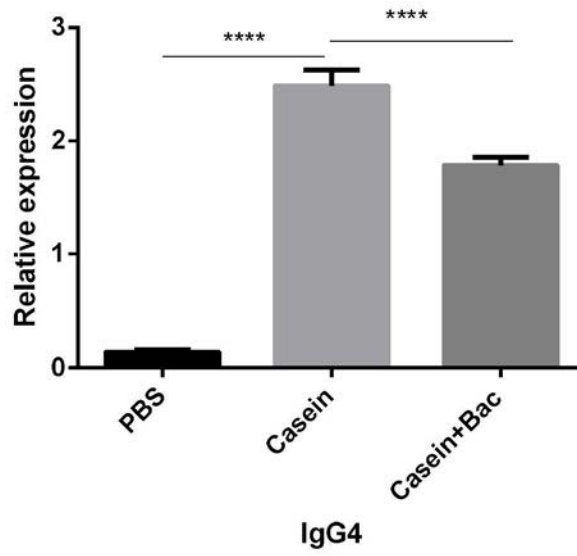


图12

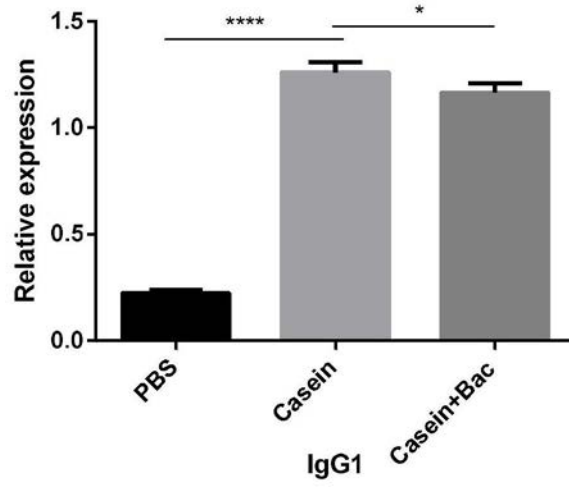


图13

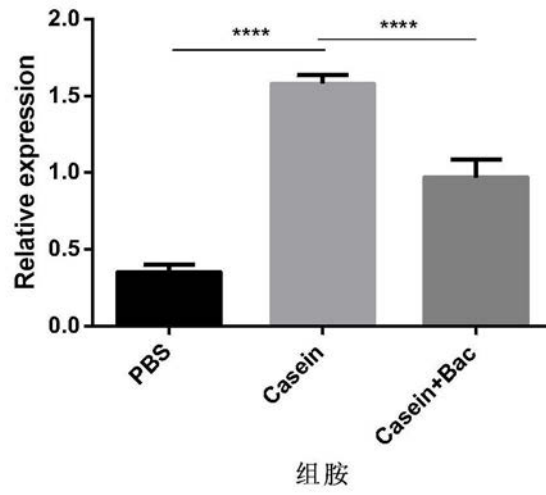


图14

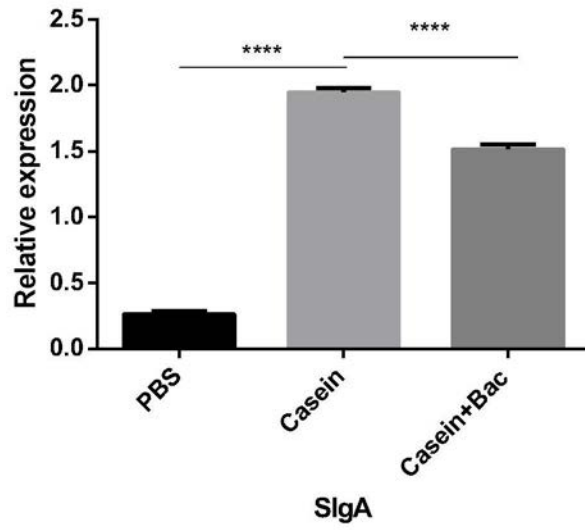


图15

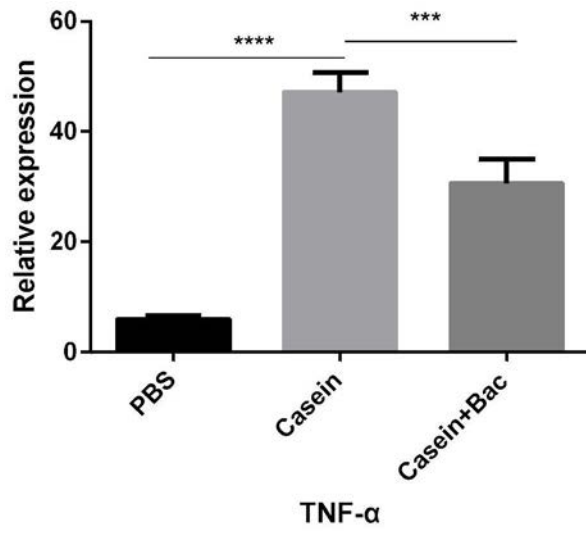


图16

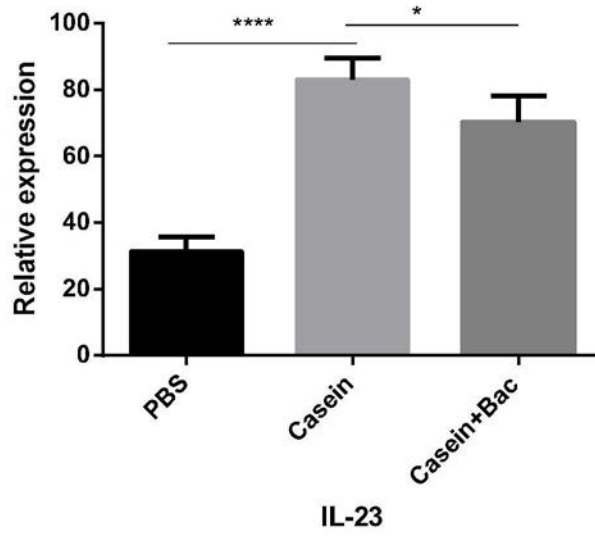


图17

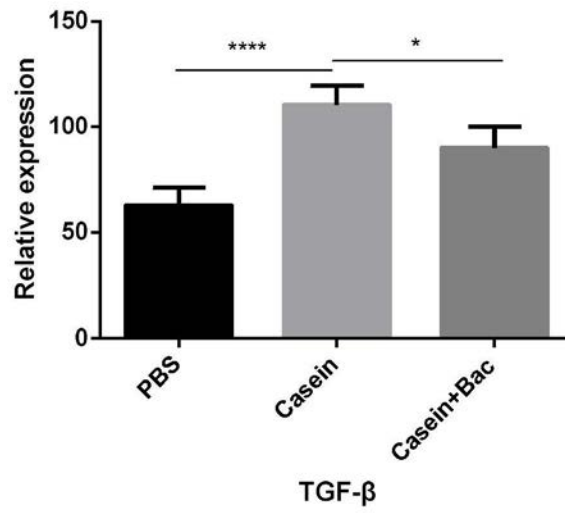


图18

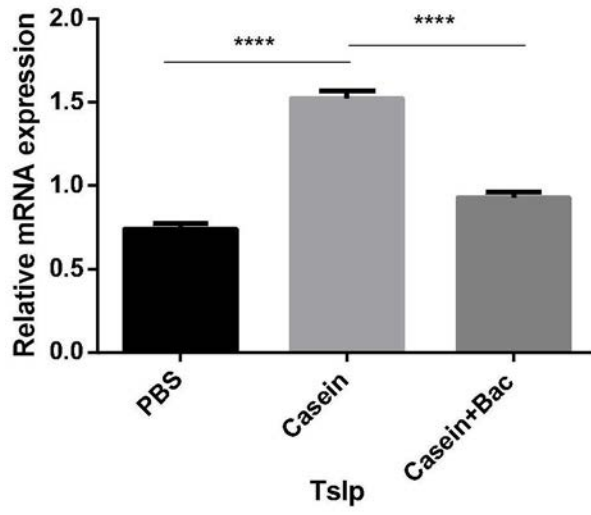


图19

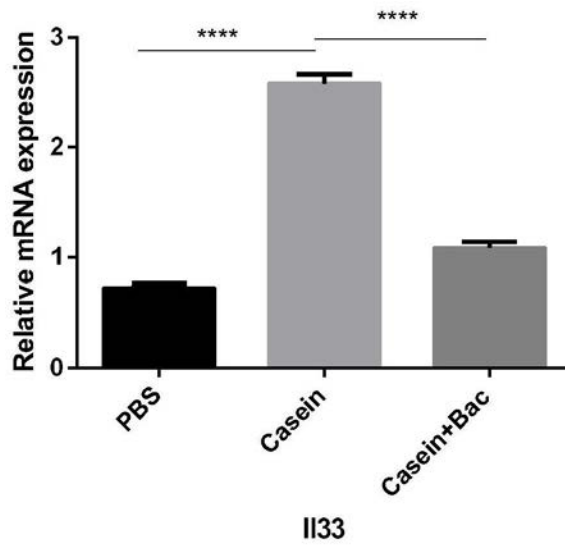


图20

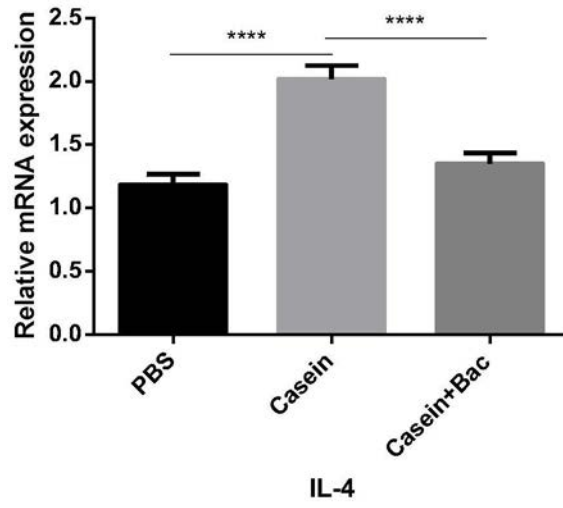


图21

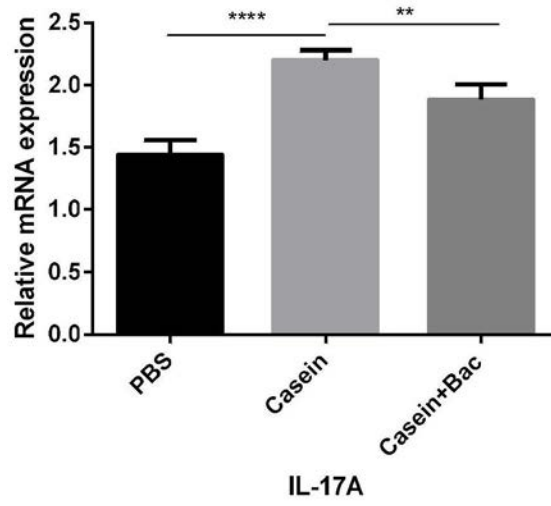
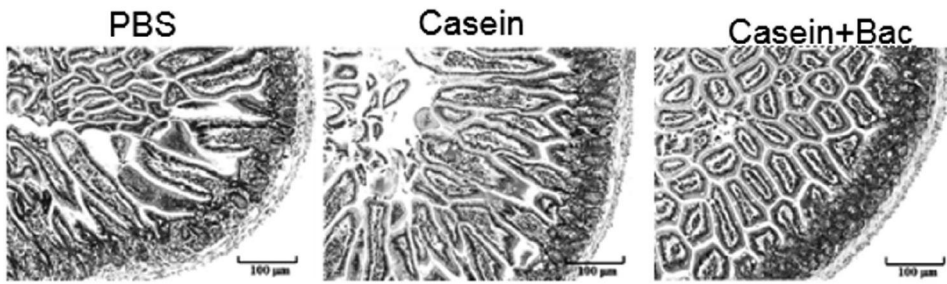


图22



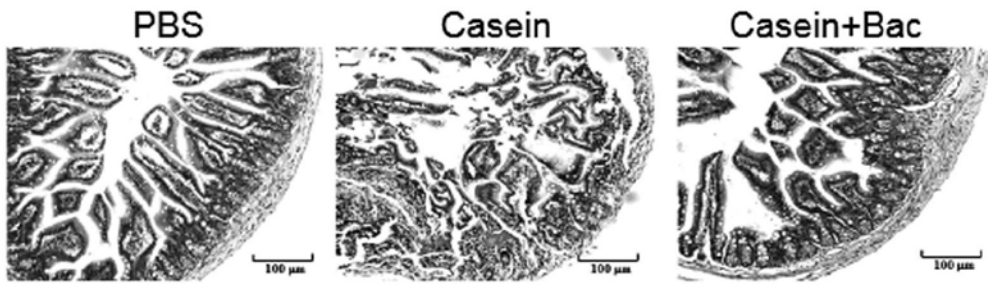
十二指肠

图23



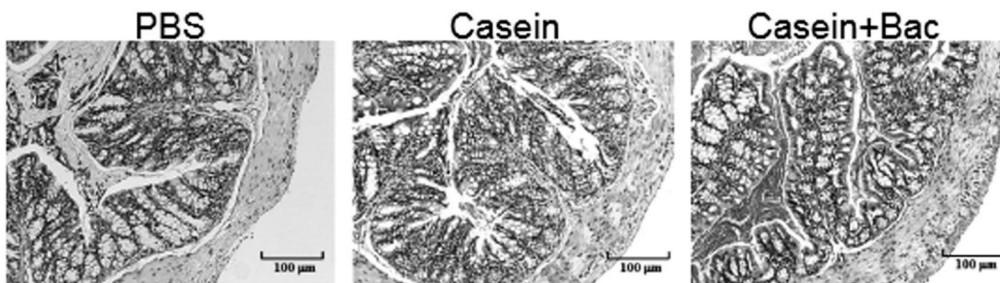
空肠

图24



回肠

图25



结肠

图26

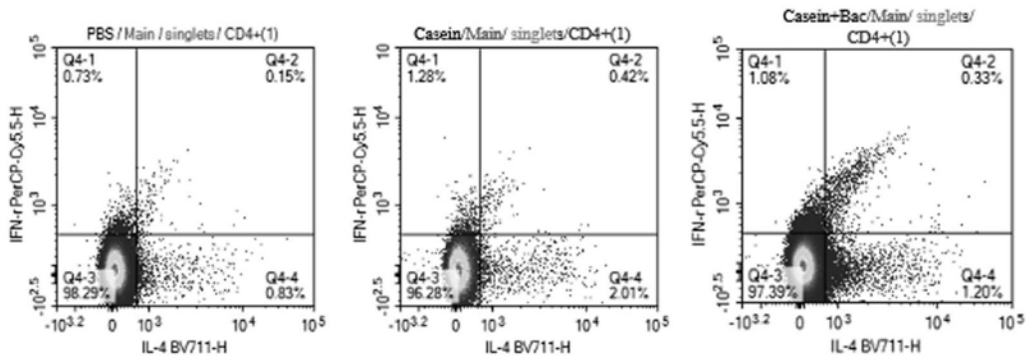


图27

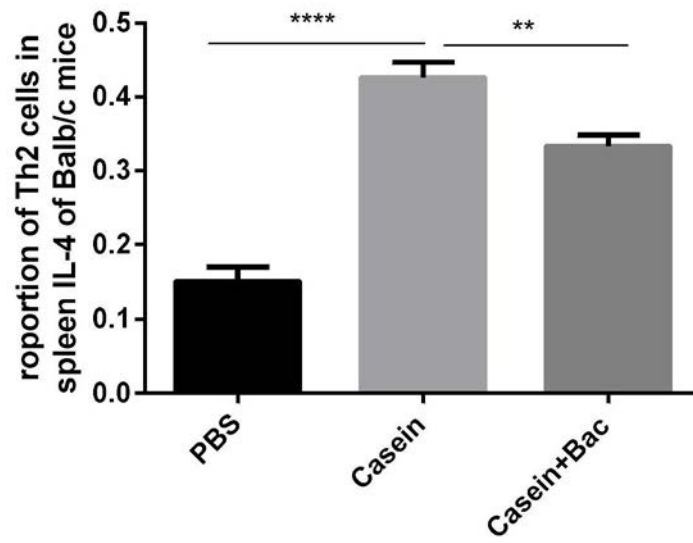


图28

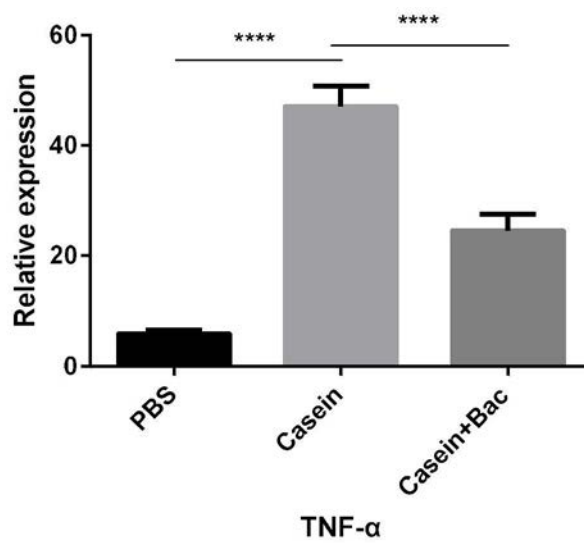


图29

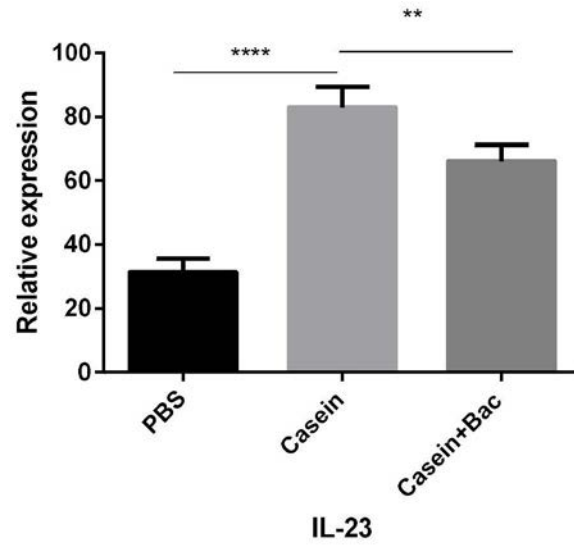


图30

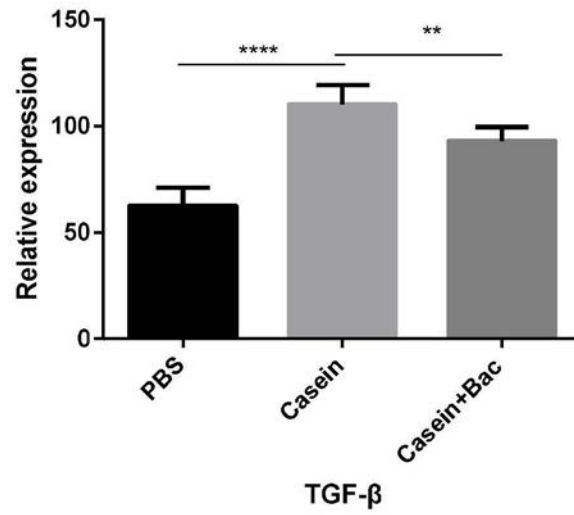


图31

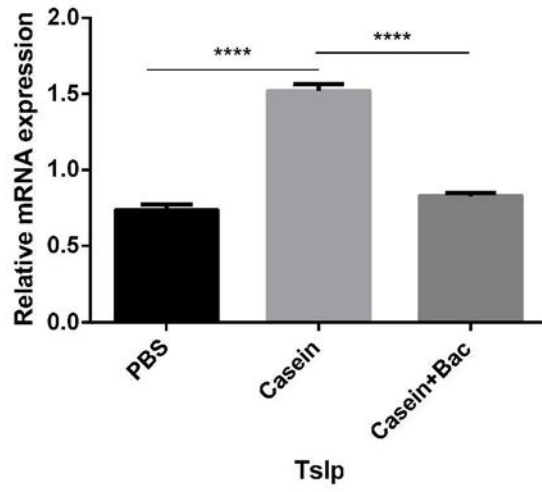


图32

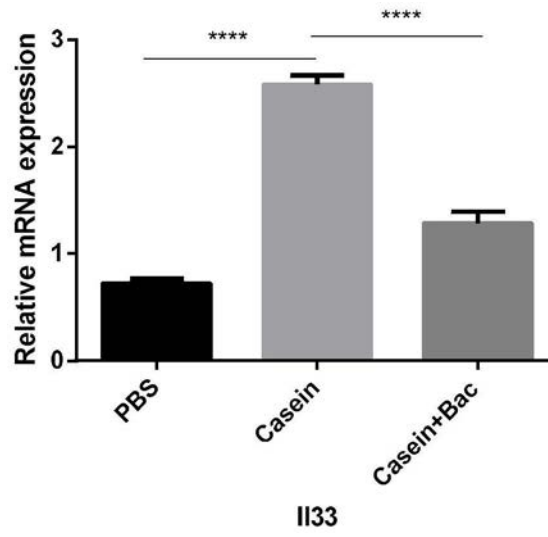


图33

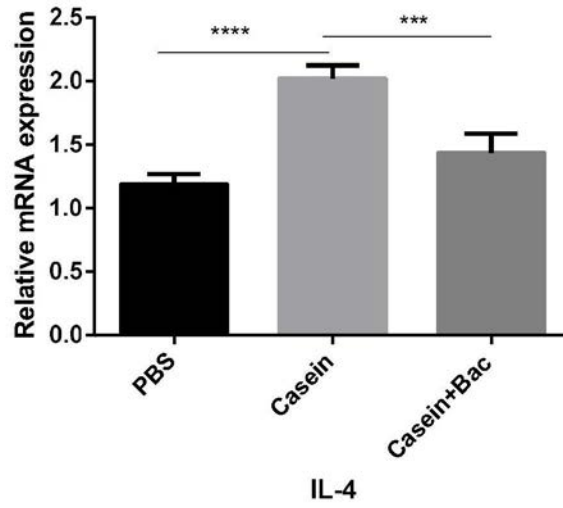


图34

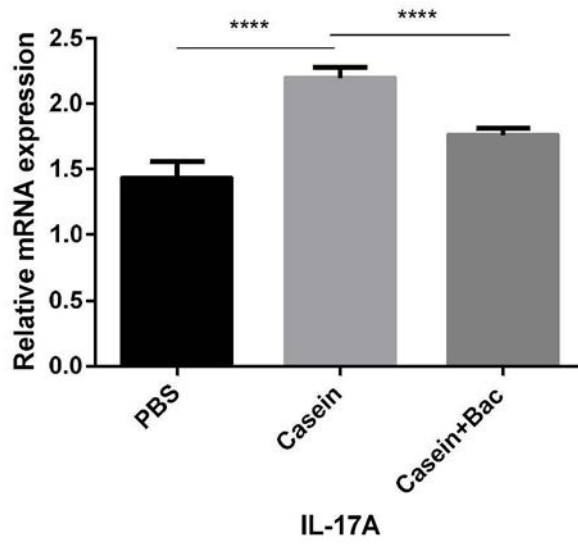


图35



十二指肠

图36

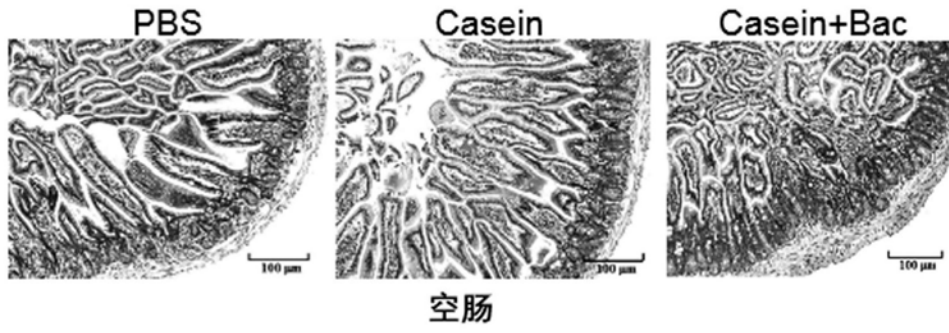


图37



图38

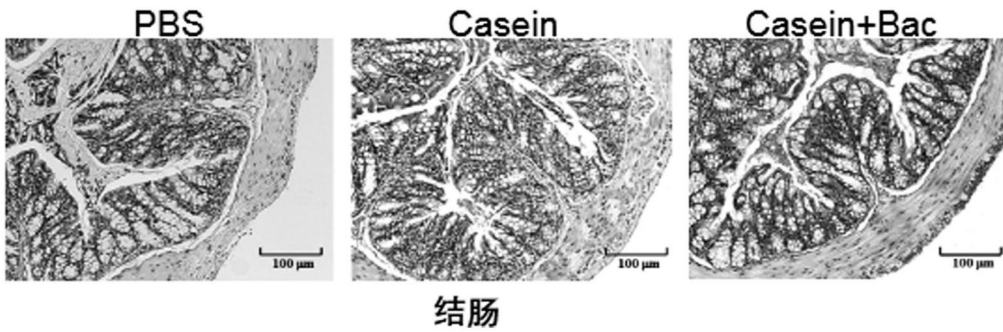


图39

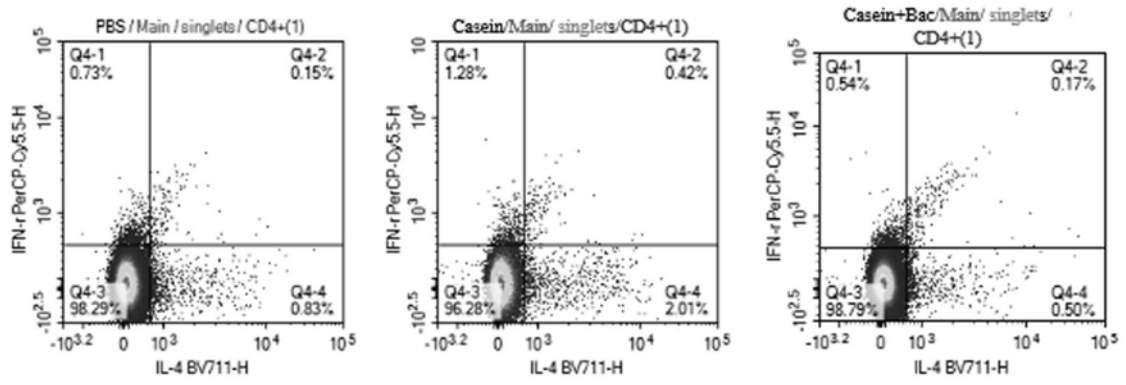


图40

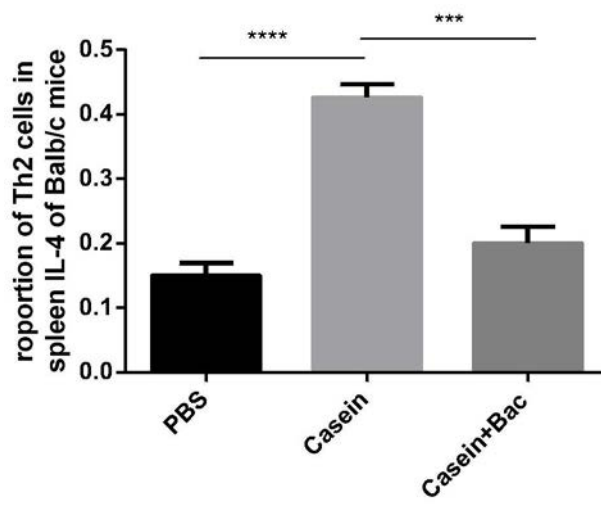


图41