

多联乳杆菌组合物及其在女性阴道健康中的应用

技术领域

本发明涉及微生物领域，具体涉及多联乳杆菌组合物及其在女性阴道健康中的应用。

背景技术

从期刊实用妇科杂志公开的文献《阴道微生态的研究进展及临床意义》、期刊中国微生物学杂志公开的文献《乳杆菌在阴道微生态中生存状态的研究进展》等各方研究报告可知，人体阴道内有 300 多种微生物共生，它们彼此制约、相互制衡，形成动态平衡，多种阴道炎的发生和阴道微生态环境失衡有关。

健康的育龄女性阴道是一个以乳杆菌为优势菌群的微环境，它们可以利用阴道上皮细胞内的糖原生长，并产 H_2O_2 、乳酸、细菌素等，还可以竞争性黏附于阴道上皮，占据结合位并消耗阴道内营养，从而在阴道内占据优势地位，抑制其他致病菌和厌氧菌的过度增殖。最近十多年的研究发现，人体阴道内乳杆菌多样性非常丰富，不同乳杆菌在阴道微环境协同发挥作用，而且不同地域和人群中的乳杆菌类型不同，从宏观上看，不同的种族，健康女性阴道内的优势菌有明显差异（据研究，80%-90%的亚洲人和白人优势菌为乳杆菌，而不到 60%的黑人和西班牙人为乳杆菌），从微观上看，同种族，不同个体之间优势乳杆菌存在个体差异。目前，从阴道微环境分离出的乳杆菌已超过 20 种，北美女性阴道生态菌群主要可分为 5 种类型，有 4 种分别以卷曲乳杆菌（*Lactobacillus crispatus*）、惰性乳杆菌（*Lactobacillus iners*）、詹氏乳杆菌（*Lactobacillus jensenii*）和格氏乳杆菌（*Lactobacillus gasseri*）为优势菌，第 5 种是其他乳酸菌和厌氧菌，中国健康女性阴道最常见的优势乳杆菌有卷曲乳杆菌、格氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、约氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌、惰性乳杆菌等。

当环境因素或者外界干预打破了阴道微生态平衡，会使阴道微生态环境进入一个脆弱的状态，不容易抵御致病菌的繁殖、侵犯，出现各种阴道炎症。细菌性阴道炎（bacterial vaginosis，以下简称“BV”），是一种常见的妇科疾病，感染率在 15%-52%，是以阴道加德纳菌和其他厌氧菌为主过度繁殖取代乳杆菌，造成阴道内菌群失调而出现的临床症候群的一种阴道感染性疾病，据资料报道，BV 是导致组织性绒毛膜炎、羊水感染、剖腹产后子宫内膜炎及其他妊娠不良和妊娠并发症的危险因素。

针对 BV，临床治疗方法是采用甲硝唑或克林霉素，甲硝唑是一种前体药，在无氧环境中，细菌胞内酶促还原将甲硝唑的硝基还原成氨基，从而将抗生素转化为活性形式，然后通过与 DNA 共价结合破坏其螺旋结构并导致单链和双链断裂，进而使 DNA 降解和病原体死亡；克林霉素能够与细菌核糖体上的 50S 核糖体亚基结合，阻止肽链的延长，从而抑制细菌细胞的蛋白质合成，导致细菌死亡。采用抗生素治疗虽然见效快，但也存在很大缺陷，有以下两方

面：（1）对阴道微环境中所有抗生素敏感微生物均有抑制作用，因此，治疗后阴道微生态没有恢复到一个健康的、能抵御致病菌侵袭的平衡状态，被抑制或杀灭的病原微生物或者外来的病原微生物还会再度繁殖甚至致病而出现复发或新的阴道炎症；（2）微生物产生耐药性、且抗生素无法使得阴道微生态环境平衡，导致了难治性 BV。因而，抗生素治疗虽然见效快，但复发率高，3 月内复发率高达 30%。

阴道微生态失衡的治疗包括杀菌、黏膜修复、恢复阴道微生态平衡三步。杀菌是治疗阴道炎症的第一步，抑制或灭杀病原微生物，包括过度增殖的需氧菌和厌氧菌、芽生孢子或者菌丝、滴虫等。病原微生物被抑制或灭杀后，阴道黏膜的免疫修复和优势乳杆菌的恢复才是治疗阴道炎症的最终目标。在这期间，如果阴道黏膜的修复、乳杆菌的恢复过程被影响、阴道内理化环境未恢复至正常，被抑制的病原微生物或者外来的病原微生物还会再度繁殖甚至致病而出现复发或新的阴道炎症。而益生菌在阴道内可以迅速占据阴道上皮的受体，产生对阴道的保护作用，从而促使阴道恢复至正常微环境，减少阴道炎症的复发。因此，采用益生菌微生态制剂治疗 BV 是以现在的技术手段看来，最为优选的一种方式。

目前国内上市的阴道微生态制剂仅有 2 种，一种是西安正浩生物制药有限公司生产的商品名为“延华”的市售药品，包含一种肠链球菌（*Streptococcus faecalis*），该菌种不是阴道优势菌种，而且这个物种下的细菌具有条件致病性；另一种是内蒙古双奇药业股份有限公司生产的商品名为“万泽双奇”的市售药品，包含 1 种乳杆菌——德氏乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii*），该菌种不属于中国妇女阴道优势菌种。因此，采用优势乳杆菌菌种制备阴道微生态制剂用于治疗细菌性阴道炎更具有治疗优势。

中国专利文件 CN102851248 A 公开了一种用于放置细菌性阴道病的詹氏乳杆菌，其是从中国健康女性阴道内分离的优势乳杆菌。中国专利文件 CN 107794236 A 公开的一种卷曲乳杆菌及其应用，其是从中国健康女性阴道内分离的优势乳杆菌，用于治疗细菌性阴道炎。中国专利文件 CN 108004187 A 公开了一种格氏乳杆菌及其用于制备阴道抑制菌药物中的应用，其格氏乳杆菌是从中国健康女性阴道内分离的优势杆菌。而除上述列举的三份中国专利文件外，还有很多类似的从中国健康女性阴道内分离的优势乳杆菌，且其用于治疗细菌性阴道炎的相关专利文件，他们都是采用从中国健康女性阴道筛选的单一乳杆菌去治疗细菌性阴道炎。

由于人体阴道内乳杆菌多样性丰富，不同乳杆菌表现出不同的益生能力，在阴道微环境协同发挥作用，且存在个体差异，不同女性阴道内优势菌株略有区别，因此在选择对应的阴道用乳杆菌益生菌时，需要综合考虑乳杆菌的种类及不同菌种的益生能力，这也说明了单一菌株在细菌性阴道病治疗中的应用覆盖面不广，需要对优势乳杆菌菌种采用复配的方法制备阴道微生态制剂用于治疗细菌性阴道病。

发明内容

本发明的目的在于针对现有技术存在的问题，提供一种属于中国妇女阴道的优势菌株的多联乳杆菌组合物，菌株之间互利共生、不产生拮抗作用，且具有协同效应，产生了比单一优势菌株更强的益生能力，且由于是多联乳杆菌，其在细菌性阴道病的治疗中覆盖面更广。

本发明所述多联乳杆菌组合物是基于中国健康女性阴道内分离筛选出的优势菌株。具体地说，多联乳杆菌组合物至少包括以下三种活性成分：

约氏乳杆菌（*Lactobacillus johnsonii*）、格氏乳杆菌（*Lactobacillus gasseri*）、鼠李糖乳杆菌（*Lactobacillus rhamnosus*）、卷曲乳杆菌（*Lactobacillus crispatus*）、詹氏乳杆菌（*Lactobacillus jensenii*）。

值得也别强调的是，上述约氏乳杆菌为约氏乳杆菌 Ljohn-1（保藏编号：CCTCC No. 2019426）；上述格氏乳杆菌为格氏乳杆菌 Lgass-17（保藏编号：CCTCC No. 2019430）；上述鼠李糖乳杆菌为鼠李糖乳杆菌 Lrham-6（保藏编号：CCTCC No. 2019428）；上述卷曲乳杆菌为卷曲乳杆菌 Lcris-2（保藏编号：CCTCC No. 2019427）、上述詹氏乳杆菌为詹氏乳杆菌 Ljen-10（保藏编号：CCTCC No. 2019429）。上述各乳杆菌是本申请的发明人从中国健康女性阴道筛选分离出，并在 6 月 4 日保藏至中国典型培养物保藏中心（CCTCC）的菌株。

鼠李糖乳杆菌 Lrham-6 的全基因组序列上传到 EzBiocloud 后，与其能链接到所有的同种的全基因组序列比较，得到的平均核苷酸一致性（average nucleotide identity, ANI）比值如表 1 所示，证明其为新的乳杆菌株。

表 1：Lrham-6 与不同鼠李糖乳杆菌全基因组 ANI 比较

序列文件名	对比文件种属	对比文件名	ANI (%)
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_002406795.1_ASM240679v1_genomic.fna.gz	99.9524
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_002406745.1_ASM240674v1_genomic.fna.gz	99.9515
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_002406715.1_ASM240671v1_genomic.fna.gz	99.9506
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_000173255.2_ASM17325v2_genomic.fna.gz	99.9388
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_002406785.1_ASM240678v1_genomic.fna.gz	99.9366
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_001812155.1_ASM181215v1_genomic.fna.gz	99.8953
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_001062955.1_ASM106295v1_genomic.fna.gz	99.7943
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌（ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ）	GCA_001064785.1_ASM106478v1_genomic.fna.gz	99.7669

a	<i>rhamnosus</i>)	c.fna.gz	
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i>	GCA_001657135.1_ASM165713v1_genomic.fna.gz	99.6405
a	<i>rhamnosus</i>)	c.fna.gz	
Lrham-6.genomic.fasta	鼠李糖乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i>	GCA_001062885.1_ASM106288v1_genomic.fna.gz	99.6173
a	<i>rhamnosus</i>)	c.fna.gz	

将格氏乳杆菌 Lgass-17 的全基因组序列上传到 EzBiocloud 后, 与其能链接到所有的同种的全基因组序列比较, 得到的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 比值如表 2 所示, 证明其为新的乳杆菌株。

表 2: Lgass-17 与不同格氏乳杆菌全基因组 ANI 比较

序列文件名	对比文件种属	对比文件名	ANI (%)
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000177035.2_ASM17703v2_genomic.fna.gz	99.9256
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000177415.1_ASM17741v1_genomic.fna.gz	99.8912
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000176995.2_ASM17699v2_genomic.fna.gz	99.7935
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_001063045.1_ASM106304v1_genomic.fna.gz	99.776
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_001066235.1_ASM106623v1_genomic.fna.gz	99.7531
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000439915.1_L.gasseri_2016_V1_genomic.fna.gz	99.7284
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_001063065.1_ASM106306v1_genomic.fna.gz	99.7232
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000014425.1_ASM1442v1_genomic.fna.gz	99.6302
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000155935.2_Lacto_gasseri_MV-22_V2_genomic.fna.gz	99.5271
Lgass-17.genomic.fasta	格氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus gasseri</i>)	GCA_000283135.1_ASM28313v1_genomic.fna.gz	99.2187

将约氏乳杆菌 Ljohn-1 的全基因组序列上传到 EzBiocloud 后, 与其能链接到所有的同种的全基因组序列比较, 得到的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 比值如表 3 所示, 证明其为新的乳杆菌株。

表 3: Ljohn-1 与不同约氏乳杆菌全基因组 ANI 比较

序列文件名	对比文件种属	对比文件名	ANI (%)
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_000498675.1_ASM49867v1_genomic.fna.gz	95.5668

Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253275.1_ASM225327v1_genomic.fna.gz	95.4233
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253205.1_ASM225320v1_genomic.fna.gz	95.3823
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253165.1_ASM225316v1_genomic.fna.gz	95.3732
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253185.1_ASM225318v1_genomic.fna.gz	95.3683
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253245.1_ASM225324v1_genomic.fna.gz	95.3515
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002253285.1_ASM225328v1_genomic.fna.gz	95.3379
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_001270785.1_ASM127078v1_genomic.fna.gz	95.3079
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_001572665.1_ASM157266v1_genomic.fna.gz	95.1633
Ljohn-1.genomic.fasta	约氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus johnsonii</i>)	GCA_002803395.1_ASM280339v1_genomic.fna.gz	95.0963

将詹氏乳杆菌 Ljen-10 的全基因组序列上传到 EzBiolcloud 后, 与其能链接到所有的同种的全基因组序列比较, 得到的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 比值如表 4 所示, 证明其为新的乳杆菌株。

表 4: Ljen-10 与不同詹氏乳杆菌全基因组 ANI 比较

序列文件名	对比文件种属	对比文件名	ANI (%)
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_002848045.1_ASM284804v1_genomic.fna.gz	88.9784
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_000155915.2_Lacto_jensenii_1153_V2_genomic.fna.gz	88.7036
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_001936235.1_ASM193623v1_genomic.fna.gz	88.6759
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_002863405.1_ASM286340v1_genomic.fna.gz	88.6432
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_000466805.1_ASM46680v1_genomic.fna.gz	88.5848
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_000162335.1_ASM16233v1_genomic.fna.gz	88.5791
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_000175035.1_ASM17503v1_genomic.fna.gz	88.5055
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_001436455.1_ASM143645v1_genomic.fna.gz	88.4346

Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_001012665.1_IM18-1v1_genomic.fna.gz	88.4042
Ljen-10.genomic.fasta	詹氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	GCA_001012685.1_IM18-3v1_genomic.fna.gz	88.3924

2. 曲乳杆菌 Lcris-2 的全基因组序列上传到 EzBioCloud 后, 与其能链接到所有的同种的全基因组序列比较, 得到的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 比值如表 5 所示, 证明其为新的乳杆菌株。

表 5: Lcris-2 与不同卷曲乳杆菌全基因组 ANI 比较

序列文件名	对比文件种属	对比文件名	ANI (%)
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_002861765.1_ASM286176v1_genomic.fna.gz	99.3638
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_001546015.1_ASM154601v1_genomic.fna.gz	99.2264
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_000176975.2_ASM17697v2_genomic.fna.gz	99.2008
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_001546025.1_ASM154602v1_genomic.fna.gz	99.1693
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_001541585.1_ASM154158v1_genomic.fna.gz	99.0587
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_001541515.1_ASM154151v1_genomic.fna.gz	99.0447
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_000301135.1_Lact_cris_FB077-07_V1_genomic.fna.gz	99.0328
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_002861775.1_ASM286177v1_genomic.fna.gz	99.0016
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_000466885.2_ASM46688v2_genomic.fna.gz	98.9705
Lcris-2.genomic.fasta	卷曲乳杆菌 (<i>Lactobacillus crispatus</i>)	GCA_000301115.1_Lact_cris_FB049-03_V1_genomic.fna.gz	98.9698

上述多联乳杆菌组合物活菌数为 $10^5 \sim 10^{11}$ cfu/g, 每种单菌含量不低于 10^5 cfu/g。

本发明中, 提供以上述多联乳杆菌组合物为活性成分的菌剂, 菌剂可为悬浮液或冻干菌粉。

本发明中, 上述多联乳杆菌组合物在在制备用于预防、治疗细菌性阴道炎致病菌药品或保健品中的应用。

本发明中, 上述多联乳杆菌组合物能应用在制备外生殖器卫生用品中, 比如卫生巾、卫生棉条或用于外生殖器的卫生护理液。

本发明中, 上述多联乳杆菌组合物能应用还能够应用在制备调节阴道菌群平衡的药品或卫生保健品中。

本发明中, 上述多联乳杆菌组合物能应用在制备具有阴道上皮细胞粘附功能的药品或卫生保健品中。

本发明中, 上述多联乳杆菌组合物能应用在制备具有预防、治疗致病菌的药品、保健品、食品添加剂的用途, 致病菌包括但不限于阴道加德纳菌、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、大肠杆菌、乙型副伤寒沙门氏菌和痢疾志贺菌中的任意一种或多种。

多联乳杆菌组合物还能够应用在制备剖腹产婴儿外用护理品中的应用。由于剖腹产的婴儿未经过女性阴道, 因此, 在其生产过程中没有获得外源的益生菌, 因此, 可以将妇女阴道中筛选得到的益生菌做成外用护理品给婴儿身体涂抹或洗澡。

本发明与现有技术相比, 具有以下有益效果:

健康女性阴道内定植的乳杆菌具有菌种多样性, 不同菌种或相同菌种的不同菌株在不同益生能力存在差异, 因此在选择阴道用乳杆菌益生菌时, 需要综合考虑乳杆菌的种类, 产乳酸、产过氧化氢能力、对致病菌的抑制能力、阴道细胞粘附的能力。为了尽可能覆盖阴道菌群失调的女性, 同时为了增强抑制不同致病菌的能力, 发明人将在中国健康女性分离筛选得到的多种菌株中选出合适菌株进行合理配伍, 将分离筛选得到的乳杆菌, 采用三种或以上乳杆菌组合配方的方式, 来预防和治疗细菌性阴道炎, 由于通过实验验证, 多联乳杆菌组合物产生了更好益生能力, 且属于中国女性阴道优势菌株, 因此, 可期的, 其对中国女性阴道疾病的治疗和预防会产生更好的效果, 且覆盖范围广。

附图说明

图1为单菌及组合菌产过氧化氢评分比较图。

图2为单菌及组合菌产乳酸能力比较图。

图 3 为单菌及组合菌对阴道加德纳菌抑制能力比较图。

图 4 为单菌及组合菌对 heLa 细胞粘附能力比较图。

图 5 为单菌及组合菌对金黄色葡萄球菌抑制能力比较图。

图 6 为单菌及组合菌对大肠杆菌抑制能力比较图。

图 7 为单菌及组合菌对绿脓假单胞菌抑制能力比较图。

图 8 为单菌及组合菌对痢疾志贺菌抑制能力比较图。

图 9 为单菌及组合菌对乙型副伤寒沙门氏菌抑制能力比较图。

图 10 为多联乳杆菌中各单菌之间的固体共生效应试验图 1。

图 11 为多联乳杆菌中各单菌之间的肉汤共生效应试验图 2。

具体实施方式

以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述，本发明的实施方式包括但不限于下列实施例。为了避免过多不必要的细节，在以下实施例中对于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的相同含义。以下实施例中所用的试剂耗材，如无特殊说明，均为常规生化试剂。

约氏乳杆菌 Ljohn-1、格氏乳杆菌 Lgass-17、卷曲乳杆菌 Lcris-2、詹氏乳杆菌 Ljen-10、鼠李糖乳杆菌 Lrham-6 的筛选分离方法如下：

用阴道棉拭子采集 20-40 岁通过健康体检的中国女性的阴道分泌物样品；取 2 mL 无菌无氧的 PBS 缓冲液于装有上述棉拭子的厌氧管中，充分震荡混匀，并以其为原液连续十倍梯度稀释；取 100 μ L 稀释 10000 倍的液体涂布于 MRS 固体培养基，置于厌氧培养箱中 37°C 培养，培养 48h 后，挑取疑似乳杆菌单菌落在 MRS 肉汤培养基中培养 24h，并将培养后得到菌液的一部分转接继续培养，菌液的另一部分进行细菌 DNA 提取；通过细菌 16S rRNA 基因扩增及测序，并将测序结果 BLAST 对比，根据对比结果分析菌种并分别保藏，得到共计 1336 株乳杆菌。通过对上述保藏的 1336 株乳杆菌进行低 pH 生长耐受试验、16S rRNA 基因型筛选、抑制阴道加德纳菌试验、产乳酸试验、产过氧化氢试验、粘附 HeLa 细胞试验筛选后，筛选出对应的上述乳杆菌。

本发明所述的乳杆菌的筛选方法包括以下步骤：

1. 低 pH 生长耐受试验

1.1 活化：保藏乳杆菌在 pH 值 6.5 的 MRS 肉汤活化，37 °C 过夜培养；

1.2 转接：将活化菌液转接至 pH 值 4-5 的 MRS 肉汤培养中，每 2-3 h 测量一次 OD₆₀₀ 值；

替换页（细则第26条）

1.3 比较 OD₆₀₀ 值，筛选能够快速增殖或 OD₆₀₀ 值较高的来自不同样品的菌株。

2.16S rRNA 基因型筛选

分离自同一样品的相同种属的乳杆菌，若 16S rRNA 序列不同，表明其基因型不同，则其生理特性也可能有差异，因此对经过低 pH 培养活力比对筛选出的乳杆菌进行 16S rRNA 基因型筛选。

3.抑制阴道加德纳菌试验

乳杆菌经活化后，取 0.1 mL 菌液与 MRS 固体培养基混匀，倾注入 6 cm 平皿内，完全凝固后 37 °C 培养 48 h，取出平皿，用内径 6 mm 的打孔器在琼脂培养基上打孔，获得菌饼；阴道加德纳菌经活化转接后，用无氧无菌 PBS 缓冲液以 10 倍梯度，将加德纳菌菌液稀释至 100 倍，分别取 10⁻¹ 和 10⁻² 稀释液 0.5 mL 与 5.25 mL 含 5% 马血清的 BHI 固体培养基混匀，倾注入 9 cm 平皿内，完全凝固后，将乳酸菌菌饼轻放在 BHI 琼脂表面，每皿对称放 4 个菌饼，每株菌 2 个平行，放入厌氧的密封罐中，加厌氧产气袋，平皿正置培养 48 h，用游标卡尺测量抑菌圈大小。

4.产乳酸试验

乳杆菌经活化后，转接至 MRS 肉汤培养基中，2 个平行，37 °C 条件下培养 48 h，用 pH 0.5-5.0 试纸测定并记录培养 48 h 的乳杆菌菌液 pH 值，按以下两个条件选择菌株进行液相色谱：条件一，pH 值为 2.5 的菌株进行液相色谱；条件二，同种属的乳杆菌，挑取 pH 值较低的菌株进行液相色谱；确定液相色谱样品后，将上清液稀释 5 倍，加入浓硫酸进行前处理，上样前用 0.22μm 针头滤器过滤。液相色谱相关参数如下：

仪器型号：Agilent，分析型液相色谱 1200

色谱柱型号：伯乐，Aminex HPX-87H

流动相：0.005 M H₂SO₄，速度 0.6 mL/min

检测器及检测波长：DAD，207 nm；RID,示差折光信号

进样量：20 μL。

5.产过氧化氢能力

乳杆菌经活化后，用移液器吸取 2 μL 菌液点种于含 0.25 mg/mL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液及 0.01 mg/mL 辣根过氧化物酶的 MRS 琼脂中，在 24 h、48 h 和 72 h 观察时间点设置 2 个平行并将相同观察时间点的平皿置于相同的厌氧密封罐中，加入厌氧产气袋，37 °C 条件下培养，培养满相应时间后，取出相应平皿，暴露于空气中，30 min 后观察显色反应并拍照记录：

以德氏乳杆菌为阳性对照，比德氏乳杆菌产生的蓝色深计为 4 分，与德氏乳杆菌产生的蓝色相当计为 3 分，比德氏乳杆菌产生的蓝色浅计为 2 分，显蓝色非常弱计为 1 分（轻微显色反应），不变色的计 0 分。

6. 粘附 HeLa 细胞试验

乳杆菌经活化后，离心洗涤菌体 2 次，PBS 重悬，吸取 100 μ L 乳杆菌悬浮液于含 HeLa 细胞的 96 孔细胞培养板，37 $^{\circ}$ C 静置孵育 30 min，用无菌 PBS 洗涤 2 次以洗去未粘附乳杆菌，然后每孔加入 25 μ L 胰酶溶液，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱消化细胞，待 HeLa 细胞消化变成球状后，每孔加入 75 μ L 完全培养基，反复吹打均匀，完全消化后吸取 20 微升菌悬液，用无菌 PBS 10 倍梯度稀释，选择适当稀释梯度进行倾注法计数实验，37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后计数。

上述及下述所用到的细菌培养基成分及配制方法如下：

MRS 肉汤制备：称量 MRS 成品培养基粉末 52.0 g，溶解至 1 L 蒸馏水中；加热煮沸，凉至室温加入 0.55 g 半胱氨酸盐酸盐，搅拌溶解后调节 pH 值至 6.5；装上定量分液器并通 N_2 ，加热至沸腾，在微沸状态下煮 20 min，冷却后分装至 10 mL 厌氧管中，118 $^{\circ}$ C 高温湿热灭菌 20 min，荫凉、避光存放、备用。

MRS 固体培养基制备：称量 MRS 成品培养基粉末 52.0 g，琼脂粉 15.0 g，溶解至 1 L 蒸馏水中，加热煮沸，沸腾后加入 0.55 g 半胱氨酸盐酸盐，调节 pH 值至 6.5，118 $^{\circ}$ C 高温湿热灭菌 20 min，荫凉、避光存放、备用。

过氧化氢半定量培养基制备：称量 MRS 成品培养基粉末 52.0 g，琼脂粉 15.0 g，溶解至 1 L 蒸馏水中，调节 pH 值至 6.5，118 $^{\circ}$ C 高温湿热灭菌 20 min，灭菌结束后放入 50 $^{\circ}$ C 水浴锅保温 30 min，加入 TMB(使 TMB 终浓度为 0.25 mg/mL)和 HRP(使 HRP 终浓度为 0.01 mg/mL)混匀；冷却凝固后，标记培养基名称及配制日期，放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

无氧 PBS 的配制：称量磷酸二氢钾 0.27 g，磷酸氢二钠 1.42 g，氯化钠 8 g，氯化钾 0.2 g，溶解至 1 L 的蒸馏水中，加热煮沸，凉至室温加入 0.55 g 半胱氨酸盐酸盐，搅拌溶解后调节 pH 值至 6.5，装上定量分液器并通 N_2 ，加热至沸腾，在微沸状态下煮 30 min，冷却后分装至 10 mL 厌氧管中，121 $^{\circ}$ C 高温湿热灭菌 30 min，荫凉、避光存放、备用。

无氧 BHI 液体培养基配制：称量 BHI 成品培养基粉末 37.0 g，溶解至 1 L 蒸馏水中，加热煮沸，凉至室温加入 0.55 g 半胱氨酸盐酸盐，搅拌溶解后调节 pH 值至 6.5，装上定量分液器并通 N_2 ，加热至沸腾，在微沸状态下煮 20 min，冷却和分装过程中通入 N_2 和 CO_2 （1:1 比例），分装至 10 mL 厌氧管中，118 $^{\circ}$ C 高温湿热灭菌 20 min，荫凉、避光存放、备用。

无氧 BHI 半固体培养基配制：称量 BHI 成品培养基粉末 37.0 g，溶解至 1 L 蒸馏水中；

替换页（细则第26条）

加热煮沸，凉至室温加入 6 g 琼脂粉，0.55 g 半胱氨酸盐酸盐，搅拌溶解后调节 pH 值至 6.5，装上定量分液器并通 N₂，加热至沸腾，在微沸状态下煮 20 min，稍稍冷却，冷却和分装过程中通入 N₂ 和 CO₂（1:1 比例），及时分装至 10 mL 厌氧管中，118 °C 高温湿热灭菌 20 min，荫凉、避光存放。

营养肉汤液体培养基配制：称量蛋白胨 10 g，牛肉粉 3 g，氯化钠 5 g 溶解至 1 L 蒸馏水中，调节 pH 至 7.2，加热煮沸，凉至室温后分装，每支 10 mL；121 °C 高温湿热灭菌 15 min，荫凉、避光存放、备用。

营养肉汤固体培养基配制：称量蛋白胨 10 g，牛肉粉 3 g，氯化钠 5 g，琼脂粉 6 g 溶解至 1 L 蒸馏水中，调节 pH 至 7.2，稍稍冷却，及时分装至 10 mL 厌氧管中；121 °C 高温湿热灭菌 15 min，荫凉、避光存放、备用。

为描述方便，下述约氏乳杆菌 Ljohn-1（保藏编号：CCTCC No. 2019426）以下简称“A”，卷曲乳杆菌 Lcris-2（保藏编号：CCTCC No. 2019427）以下简称“B”，鼠李糖乳杆菌 Lrham-6（保藏编号：CCTCC No. 2019428）以下简称“C”，詹氏乳杆菌 Ljen-10（保藏编号：CCTCC No. 2019429）以下简称“D”，格氏乳杆菌 Lgass-17（保藏编号：CCTCC No. 2019430）以下简称“E”。

实施例 1：单菌和组合乳杆菌产乳酸能力对比。

单一菌：乳杆菌经活化后，转接至 MRS 肉汤培养基中，2 个平行，37 °C 条件下培养 48 h，用 pH 0.5-5.0 试纸测定并记录培养 48 h 的乳杆菌菌液 pH 值，让菌株进行液相色谱，将上清液稀释 5 倍，加入浓硫酸进行前处理，上样前用 0.22 μm 针头滤器过滤。

组合菌：乳杆菌经活化转接后，选择 3 种及以上的菌株混合培养，3 个平行，37 °C 条件下培养 48 h，离心，上清液稀释 5 倍，加入浓硫酸进行前处理，上样前用 0.22 μm 针头滤器过滤。液相色谱相关参数如下：

仪器型号：Agilent，分析型液相色谱 1200

色谱柱型号：伯乐，Aminex HPX-87H

流动相：0.005 M H₂SO₄，速度 0.6 mL/min

检测器及检测波长：DAD，207 nm；RID，示差折光信号

进样量：20 μL。

实施例 2：单菌和组合乳杆菌产过氧化氢能力对比。

单一菌：乳杆菌经活化后，用移液器吸取 2 μL 菌液，点种于含 0.25 mg/mL 的 3,3',5,5'-

四甲基联苯胺溶液及 0.01 mg/mL 的辣根过氧化物酶的 MRS 琼脂中, 在 24 h、48 h 和 72 h 观察时间点设置 2 个平行并将相同观察时间点的平皿置于相同的厌氧密封罐中, 37 °C 培养, 培养满相应时间后, 取出相应平皿, 暴露于空气中, 30 min 后观察显色反应并拍照记录: 以德氏乳杆菌为阳性对照, 比德氏乳杆菌产生的蓝色深计为 4 分, 与德氏乳杆菌产生的蓝色相当计为 3 分, 比德氏乳杆菌产生的蓝色浅计为 2 分, 显蓝色非常弱计为 1 分 (轻微显色反应), 不变色的计 0 分。

组合菌: 乳杆菌经活化转接后, 选择 3 种及以上的菌株混合, 用移液器吸取 2 μ L 菌液点种于含 TMB 及 HRP 的 MRS 琼脂中, 37 °C 培养, 培养满相应时间后, 取出相应平皿, 暴露于空气中, 30 min 后观察显色反应并拍照记录: 以德氏乳杆菌为阳性对照, 比德氏乳杆菌产生的蓝色深计为 4 分, 与德氏乳杆菌产生的蓝色相当计为 3 分, 比德氏乳杆菌产生的蓝色浅计为 2 分, 显蓝色非常弱计为 1 分 (轻微显色反应), 不变色的计 0 分。

实施例 3 单菌和组合乳杆菌抑制阴道加德纳菌能力对比。

单菌: 乳杆菌经活化后, 取 0.1 mL 菌液与 MRS 固体培养基混匀, 倾注入 6 cm 平皿内, 完全凝固后 37 °C 培养 48 h, 取出平皿, 用内径 6 mm 的打孔器在琼脂培养基上打孔, 获得菌饼; 阴道加德纳菌经活化转接后, 用无氧无菌 PBS 缓冲液以 10 倍梯度, 将加德纳菌菌液稀释至 100 倍, 分别取 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释液 0.5 mL 与 5.25 mL 含 5% 马血清的 BHI 固体培养基混匀, 倾注入 9 cm 平皿内, 完全凝固后, 将乳杆菌菌饼轻放在 BHI 琼脂表面, 每皿对称放 4 个菌饼, 每株菌 2 个平行, 放入厌氧的密封罐中, 加厌氧产气袋, 平皿正置培养 48 h, 用游标卡尺测量抑菌圈大小。

组合菌: 乳杆菌经活化转接后, 选择 3 种及以上的菌株混合, 取 0.1 mL 菌液与 MRS 固体培养基混匀, 倾注入 6 cm 平皿内, 完全凝固后 37 °C 培养 48 h, 取出平皿, 用内径 6 mm 的打孔器在琼脂培养基上打孔, 获得菌饼; 阴道加德纳菌经活化转接后, 用无氧无菌 PBS 缓冲液以 10 倍梯度, 将加德纳菌菌液稀释至 100 倍, 分别取 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释液 0.5 mL 与 5.25 mL 含 5% 马血清的 BHI 固体培养基混匀, 倾注入 9 cm 平皿内, 完全凝固后, 将乳杆菌菌饼轻放在 BHI 琼脂表面, 每皿对称放 4 个菌饼, 每株菌 2 个平行, 放入厌氧的密封罐中, 加厌氧产气袋, 平皿正置培养 48 h, 用游标卡尺测量抑菌圈大小。

实施例 4: 单菌和组合菌粘附 HeLa 细胞能力对比。

单菌: 乳杆菌经活化后, 离心洗涤菌体 2 次, PBS 重悬, 吸取 100 μ L 乳杆菌悬浮液于含 HeLa 细胞的 96 孔细胞培养板, 37 °C 静置孵育 30 min, 30 min 后用无菌 PBS 洗涤 2 次以未洗去粘附乳杆菌, 向含 HeLa 细胞 96 孔细胞培养板每孔加入 25 μ L 胰酶溶液, 置于 37 °C 恒温

箱消化细胞，待Hela细胞消化变成球状后，每孔加入75 μL完全培养基，反复吹打均匀，完全消化后吸取20 μL菌悬液，用无菌PBS 10倍梯度稀释，选择适当稀释梯度进行倾注法计数实验，37℃培养48 h后计数。

组合菌：乳杆菌经活化转接后，离心洗涤菌体2次，PBS重悬，选择3种及以上的菌株菌液混合均匀，吸取100 μL乳杆菌悬浮液于含Hela细胞的96孔细胞培养板，37℃静置孵育30 min和4 h，30 min后及4 h后用无菌PBS洗涤2次以未洗去粘附乳杆菌；孵育满相应时间后，向含Hela细胞96孔细胞培养板每孔加入25 μL胰酶溶液，置于37℃恒温箱消化细胞，待Hela细胞消化变成球状后，每孔加入75 μL完全培养基，反复吹打均匀，完全消化后吸取20 μL菌悬液，用无菌PBS 10倍梯度稀释，选择 10^{-4} 稀释梯度进行倾注法计数实验，37℃培养48 h后计数。

实施例5：单菌和组合菌抑制金黄色葡萄球菌能力、抑制绿脓假单胞菌能力、抑制大肠杆菌能力、抑制乙型副伤寒沙门氏菌能力和抑制痢疾志贺菌能力对比。

单菌：乳杆菌经活化后，取0.1 mL菌液与MRS固体培养基混匀，倾注入6 cm平皿内，完全凝固后37℃培养48 h，取出平皿，用内径6 mm的打孔器在琼脂培养基上打孔，获得菌饼；金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、大肠杆菌、乙型副伤寒沙门氏菌和痢疾志贺菌经活化转接后，用0.9%生理盐水以10倍梯度，将病原菌菌液稀释至100倍，分别取 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释液0.5 mL与5 mL营养琼脂固体培养基混匀，倾注入9 cm平皿内，完全凝固后，将乳杆菌菌饼轻放在营养琼脂表面，每皿对称放4个菌饼，每株菌2个平行，放入密封罐中，平皿正置培养24 h，用游标卡尺测量抑菌圈大小。

组合菌：抑制乙型副伤寒沙门氏菌能力和抑制痢疾志贺菌能力

乳杆菌经活化转接后，选择3种及以上的菌株混合，取0.1 mL菌液与MRS固体培养基混匀，倾注入6 cm平皿内，完全凝固后37℃培养48 h，取出平皿，用内径6 mm的打孔器在琼脂培养基上打孔，获得菌饼；金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、大肠杆菌、乙型副伤寒沙门氏菌和痢疾志贺菌经活化转接后，用0.9%生理盐水以10倍梯度，将病原菌菌液稀释至100倍，分别取 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释液0.5 mL与5 mL营养琼脂固体培养基混匀，倾注入9 cm平皿内，完全凝固后，将乳杆菌菌饼轻放在营养琼脂表面，每皿对称放4个菌饼，每株菌2个平行，放入密封罐中，平皿正置培养24 h，用游标卡尺测量抑菌圈大小。

经过上述实施例1~实施例5对比实验，对比结果如下表6：

表6 单菌及组合菌各益生能力比较

微生物表述	微生物组成（字母前数字表示字母对应单菌株的含量比）	加德纳菌抑菌圈直径（mm）	产过氧化氢评分	乳酸含量（mg/L）	单细胞粘附数	金黄色葡萄球菌抑菌圈直径（mm）	大肠杆菌抑菌圈直径（mm）	痢疾志贺菌抑菌圈直径（mm）	绿脓假单胞菌抑菌圈直径（mm）	乙型副伤寒沙门氏菌抑菌圈直径（mm）
DS	德氏乳杆菌	14.29	3	12964.12	7.7	11.28	9.32	11.93	13.09	12.00
A	A	17.77	1	16064.53	5.95	12.39	9.65	12.41	13.28	12.45
B	B	10.19	1	16098.44	13.2	12.61	10.51	12.41	13.74	12.01
C	C	14.71	0	18001.19	8.3	13.09	11.26	12.85	14.46	11.01
D	D	15.06	4	14258.47	27.15	9.61	7.30	12.26	12.92	11.78
E	E	16.63	1	14219.11	17.8	12.61	9.29	10.98	12.00	11.52
1	1A+1B+1D	19.87	4	15117.36	8.91	12.99	10.83	13.29	14.76	13.65
2	1A+1B+1C	19.50	0	17555.32	7.5	13.47	12.26	13.58	15.84	14.52
3	1A+1B+1E	19.65	0	13703.73	1.64	12.68	11.94	15.83	15.76	13.75
4	1B+1C+1D	19.65	4	17224.19	18.83	14.16	12.40	13.55	14.34	14.47
5	1B+1D+1E	19.81	4	15562.84	7.5	13.05	9.55	12.24	14.49	13.40
6	1B+1C+1E	19.34	0	17479.38	34.67	13.35	10.17	13.85	15.30	12.58
7	1A+1C+1D	19.16	4	16974.68	49.68	13.03	9.33	16.37	15.28	13.66
8	1A+1C+1E	19.31	0	17012.27	8.75	13.53	10.52	15.72	15.59	12.54
9	1A+1D+1E	19.42	4	16769.17	19.14	13.03	10.85	14.75	15.48	13.64
10	1C+1D+1E	19.58	4	16794.06	43.5	12.78	11.20	13.67	15.28	12.74
11	1A+1B+1C+1D	19.50	4	17203.57	12.67	12.59	10.61	13.49	14.75	12.55
12	1A+1B+1C+1E	19.35	0	17023.87	13.58	13.62	11.50	15.58	15.59	13.40
13	1A+1B+1D+1E	19.50	4	13091.07	20.08	14.18	11.68	15.23	15.62	14.25
14	1B+1C+1D+1E	19.46	4	16653	14.42	12.06	10.81	13.59	14.63	12.36

				.29						
15	1A+1C+1D+1E	19.13	4	13642.85	36.42	12.17	10.61	13.73	15.01	12.59
16	1A+1B+1C+1D+1E	19.11	4	16618.79	12.17	12.84	11.13	13.94	14.82	12.96

实施例 6：多联乳杆菌中各菌株之间的拮抗效应和共生效应试验

将待测定的菌株之一在培养基平板划直线，再将待测定菌株之二横向接种在待测菌株之一的两侧，成十字交叉培养 18~24 h，测定交叉点抑菌宽度。

经过试验，各菌株之间的拮抗效应和共生效应（抑菌半径 mm）结果如下表 7：

表 7 各单菌在固体平皿上共生的抑菌圈直径（mm）

	A	B	C	D	E
A	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
D	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

将待测定的单一菌株接种于 MRS 肉汤，37 °C 培养约 8 h，同时对接种前单一菌株 10 倍梯度稀释至合适梯度，计数接种前菌液浓度，每梯度 3 平行，平皿放入厌氧的密封罐中，加厌氧产气袋，37 °C 条件下培养 48 h；然后将待测定的菌株混合后接种于 MRS 肉汤，混合菌中各菌接种浓度与单一菌株接种浓度相同，37 °C 培养约 8 h；单菌及混合菌 MRS 肉汤培养约 8 h 后，10 倍梯度稀释至合适梯度，涂布计数，每梯度三个平行，平皿放入厌氧的密封罐中，加厌氧产气袋，37 °C 条件下培养 48 h；平皿厌氧培养 48 h 后，对单菌平皿计算接种前后菌落数，分析单菌扩增倍数，同时对混合菌平皿上的菌落进行质谱鉴定，通过质谱判定菌种，进而分析混合菌中各单菌扩增倍数，经过试验，各菌株之间无抑制，能共同生长，肉汤共培养扩增数据见表 8。

表 8 各单菌在 MRS 肉汤上共生的扩增倍数

菌株编号	混合培养 质谱计算 扩增倍数- 平行 1	混合培养 质谱计算 扩增倍数- 平行 2	单菌培养 计算扩增 倍数
A	14.73	10.85	17.17
B	9.74	12.82	17.57
C	85.08	81.73	92.15
D	38.22	51.4	29.06
E	75.19	71.3	103.69

按照上述实施例，便可很好地实现本发明。值得说明的是，基于上述结构设计的前提下，为解决同样的技术问题，即使在本发明上做出的一些无实质性的改动或润色，所采用的技术方案实质仍然与本发明一样，故其也应当在本发明的保护范围内。

PCT

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/R0/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 10. 24. 39 (20200711) MT/FOP 20140331/0. 20. 5. 21
0-2	国际申请号	PCT/CN2020/107915
0-3	申请人或代理人的档案号	PCT2003
1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	12-119
1-2	行号:	
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
1-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
1-3-3	保藏日期	2019年 6月 04日 (04. 06. 2019)
1-3-4	保藏号	CCTCC NO:M2019426
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	
2	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
2-1	页码	12-119
2-2	行号:	
2-3	保藏事项	
2-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
2-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
2-3-3	保藏日期	2019年 6月 04日 (04. 06. 2019)
2-3-4	保藏号	CCTCC NO:M2019427
2-4	补充说明	
2-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
2-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

PCT

打印件(原件为电子形式)

3	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
3-1	页码	12-119
3-2	行号:	
3-3	保藏事项	
3-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
3-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
3-3-3	保藏日期	2019年 6月 04日 (04. 06. 2019)
3-3-4	保藏号	CCTCC NO:M2019428
3-4	补充说明	
3-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
3-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	
4	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
4-1	页码	12-119
4-2	行号:	
4-3	保藏事项	
4-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
4-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
4-3-3	保藏日期	2019年 6月 04日 (04. 06. 2019)
4-3-4	保藏号	CCTCC NO:M2019429
4-4	补充说明	
4-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
4-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	
5	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
5-1	页码	12-119
5-2	行号:	
5-3	保藏事项	
5-3-1	保藏单位名称	中国典型培养物保藏中心
5-3-2	保藏单位地址	中国湖北省武汉市武汉大学, 邮政编码: 430072, Hubei (CN)。
5-3-3	保藏日期	2019年 6月 04日 (04. 06. 2019)
5-3-4	保藏号	CCTCC NO:M2019430
5-4	补充说明	
5-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
5-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

PCT

打印件(原件为电子形式)

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	