

# 说明书

---

## 一种可培养厌氧菌株与猪肠上皮细胞共培养方法

### 5 技术领域

本发明属于微生物生态营养与生理领域，具体地说，涉及一种可培养厌氧菌株与猪肠上皮细胞共培养方法。

### 背景技术

- 10 动物肠道中栖息着数量庞大复杂多样的微生物菌群，大量研究表明肠道微生物与宿主营养物质代谢、肠道健康及生理状况有密切联系。目前通常采用扩增子测序或宏基因组测序方法来研究动物胃肠道微生物组成及其功能，但这些方法在很大程度上依赖于生物信息学手段，且参考数据库的完善程度决定了分析结果的正确性和精确性，无法从生理、代  
15 谢、信号转导等方面深入研究某种细菌的具体作用。

### 发明内容

有鉴于此，本发明针对上述的问题，提供了一种可培养厌氧菌株与猪肠上皮细胞共培养方法。

- 20 为了解决上述技术问题，本发明公开了一种可培养厌氧菌株与猪肠上皮细胞共培养方法，包括以下步骤：

步骤 1、采用分光光度法测定菌液的光密度值；

步骤 2、采用平板计数法测定菌液浓度；

步骤 3、通过二者的关联分析快速确定细菌个数；

- 25 步骤 4、将准确计数的微生物接种至提前培养的肠上皮细胞系。

可选地，所述步骤 1 中的采用分光光度法测定菌液的光密度值，具体为：

步骤 1.1、步骤 1.1、厌氧水制备：量取 1 L 蒸馏水倒入锥形瓶中，加入

1 mL 质量分数为 0.1 %刃天青溶液，此时液体呈蓝色；加热煮沸后，迅速用流水冷却，冷却时可用一次性 PE 手套和橡皮筋将锥形瓶瓶口密封好；然后通 CO<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> 0.5~1 h，加入 L-半胱氨酸或 L-半胱氨酸盐酸盐 1 g，此时液体呈粉红或黄色；最后再次通气 10 min，密封小火加热或密封静置 10-12 h  
5 观察到培养基变无色或淡黄色；将配制好的厌氧水，分装至密闭性良好的玻璃瓶中保存；

步骤 1.2、厌氧培养基的制备：称取 38.5 g BHI 培养基至 1L 厌氧水中，厌氧水持续通入 CO<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> 保持其厌氧状态；用玻璃棒快速搅拌，使 BHI 培养基完全溶解；取厌氧滚管通入 CO<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> 以排出空气，后用 5 mL 移液枪移  
10 取 9 mL BHI 培养基至厌氧管中，保持通气 30 s，迅速塞上丁基橡胶塞，打好铝盖，制备得到厌氧 BHI 液体培养基；在制备好的 BHI 液体培养基中加入 0.75~1.5 %琼脂制成 BHI 固体培养基培养基，分装至厌氧瓶中；将分装好的无氧培养基 121 °C 高压灭菌 20 min，制备得到厌氧 BHI 固体培养基；

步骤 1.3、可培养厌氧菌株的复活培养：将保存在冻存管或厌氧管中的菌种从-80 °C 冰箱中取出，插入冰中解冻，然后按 20 %的比例接种至上述  
15 制备好的厌氧 BHI 液体培养基， 37 °C、180 r/m 震荡培养 18-24 h；

步骤 1.4、细菌生长曲线测定：吸取 10 mL 上述复苏菌液接种至 90 mL 装有厌氧 BHI 液体培养基的厌氧瓶中， 37 °C、180 r/m 震荡培养；以未接种的厌氧 BHI 液体培养基为空白对照，从 0 h 起，每隔 2 h 测定 OD<sub>600nm</sub> 值，  
20 取样至 48 h，每次取样均做 3 个平行；以 OD<sub>600nm</sub> 值为纵坐标，培养时间为横坐标，绘制得到一条平滑的 S 型生长曲线。

可选地，所述 BHI 培养基的组成为：1 L 固体 BHI 培养基成分为 10 g 胰蛋白胨、17.5 g 牛心浸粉、5 g 氯化钠、2 g 葡萄糖，2.5 g 磷酸氢二钠，pH 值 7.4 ± 0.2，25 °C，加蒸馏水定容至 1 L、121 °C、20 min 灭菌。

25 可选地，所述步骤 2 中的采用平板计数法测定菌液浓度，具体为：

步骤 2.1、平板培养基制备：将步骤 1.2 中灭菌后的装有厌氧 BHI 液体培养基的厌氧瓶冷却至 45-50 °C，用酒精喷洒或擦拭后，与带盖平皿一起放入厌氧工作站，打开站内紫外灯灭菌 30 min；将平皿盖子稍稍打开，倒入培养基，盖好盖子，轻轻晃动，不要能沾到盖子上，静置 1 h，使培养基完全

凝固且散干水分，判断方式为平板平整、无凸起、无“挂壁”；

步骤 2.2、菌液光密度测定：在厌氧工作站中，取生长平台期的菌液，用步骤 1.2 中制备好的无氧 BHI 液体培养基作为稀释液，按 2 倍稀释得到 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 的菌液，每次取样后，用涡旋仪震荡 20 s 以充分混匀，后用高压灭菌过的移液枪快速加样，加完原液后再加相应体积的 BHI 培养基；用分光光度计测定上述 6 个不同稀释梯度菌液的  $OD_{600nm}$  值，每个稀释梯度做 3 个平行；

步骤 2.3、稀释涂布法测菌液浓度：在厌氧工作站中，取原液以及 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 稀释梯度的菌液，进行 10 倍梯度稀释；用于接种的稀释梯度一般为  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ ，每个稀释梯度做 3 个平行；用涡旋仪充分震荡后，迅速取 100  $\mu$ L 菌液，接种到步骤 2.1 中制备好的 BHI 平板上并用涂布棒涂布均匀；接种完后，放置 10-30 min，待菌液被完全吸收后，倒置平板，放入厌氧罐和厌氧产气袋或厌氧工作站，37  $^{\circ}$ C 培养 24-48 h 后对菌落进行计数；若没有厌氧罐，用 PP 密封盒或将平板放置在真空袋中，用食品真空机抽去多余气体，构成厌氧环境；

步骤 2.4、菌落计数：菌落计数：选取菌落数在 30~300 的平板，利用拍照后使用 Windows 自带画图软件和鼠标计数器软件 WinOMeter V1.5。

可选地，所述步骤 3 中的确定菌液浓度与光密度值的关系，具体为：

以  $OD_{600nm}$  值为横坐标 (X)，菌液浓度为纵坐标 (Y)，用 Excel 或 Origin 8 绘制 XY 散点图，通过线性拟合得出二者的回归曲线，观察二者是否存在线性关系， $R^2 \geq 0.8$  为强相关性。

可选地，所述步骤 4 中的将准确计数的微生物接种至提前培养的肠上皮细胞系，具体为：

步骤 4.1、猪肠上皮细胞的传代培养：于 37  $^{\circ}$ C 复苏猪空肠细胞系，利用 DMEM/F12 完全培养基在 37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  的细胞培养箱中培养 48 h，正常传代 3 次以后方可进行正式实验；

步骤 4.2、在获得活化的 IPEC-J2 细胞后，首先用胰酶将培养瓶中的 IPEC-J2 消化，然后按照  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的剂量将细胞接种在 12 孔板中，利用不含抗生素的 DMEM/F12 完全培养基 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 用于后续的细菌

共培养实验;

步骤 4.3、提前取出-80 °C 冻存的可培养厌氧菌株进行扩大培养, 18 h 后测定其 OD 值, 利用步骤 3 建立的标准曲线计算细菌数量;

5 步骤 4.4、将含有可培养厌氧菌株的培养液于 3000-5000 rpm 离心 5 分钟, 去除上清, 用不含抗生素的 DMEM/F12 培养基重悬备用;

步骤 4.5、按照 MOI=10 的剂量将可培养厌氧菌株接种至步骤 4.2 中的 IPEC-J2 细胞, 置于 37 °C 培养。

可选地, 所述的 DMEM/F12 完全培养基的组成为: 在 DMEM/F12 基础培养基的基础上加入 10 % FBS, 5 ng/mL EGF, 10 U/mL HEPES, 1 % 双抗。

10 可选地, 所述的可培养厌氧菌株为 *Akkermansia muciniphila*。

可选地, 所述的猪肠上皮细胞为 IPEC-J2 细胞。

与现有技术相比, 本发明可以获得包括以下技术效果:

1) 本发明有助于排除其他微生物或动物体内多种因素的干扰, 深入解析这些微生物的生理功能及其与宿主肠上皮细胞的互作模式。

15 2) 本发明采用的厌氧培养与计数技术能快速、简便地对厌氧菌进行复苏、培养和计数, 操作过程和设备要求简单, 成功率高, 为多种共生厌氧菌与宿主肠上皮细胞共培养模型的建立提供技术参考, 提高实验效率。

20 3) 本发明通过检测共培养体系中不同时间点宿主肠上皮细胞的形态、凋亡率、代谢产物、相关基因和蛋白的表达量等, 能快速筛选可培养厌氧菌种/株对宿主肠上皮细胞是否具有益生效果或负面影响, 为该菌种/株作为新型益生菌的开发及其产业应用提供参考数据。

当然, 实施本发明的任一产品并不一定需要同时达到以上所述的所有技术效果。

## 25 附图说明

此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解, 构成本发明的一部分, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的

不当限定。在附图中：

图 1 是本发明 *Akkermansia muciniphila* 的增值曲线与标准曲线；其中，A 图为 *Akkermansia muciniphila* 的生长曲线；B 图为不同稀释梯度下 *Akkermansia muciniphila* 的 OD 值；C 图为 *Akkermansia muciniphila* OD 值与菌落数的线性拟合关系；

图 2 是本发明 *Akkermansia muciniphila* 与猪空肠上皮细胞 (IPEC-J2) 共培养形态(X 200)；其中，左图为正常 IPEC-J2 细胞形态；右图为 *Akkermansia muciniphila* 与 IPEC-J2 细胞共培养 24 h 后的形态；

图 3 是本发明 *Akkermansia muciniphila* 对 IPEC-J2 细胞紧密连接相关基因表达量的影响；其中，CON 为对照组细胞；A-24 h 表示与 *akkermansia muciniphila* 共培养 24 h 后的 IPEC-J2 细胞。\* 表示差异显著 ( $P<0.05$ )；\*\* 表示差异极显著 ( $P<0.01$ )。

## 具体实施方式

以下将配合实施例来详细说明本发明的实施方式，藉此对本发明如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

### 实施例 1

一种可培养厌氧菌株与猪肠上皮细胞共培养方法，包括以下步骤：

步骤 1、采用分光光度法测定菌液的光密度 (OD) 值：

步骤 1.1、厌氧水制备：量取 1 L 蒸馏水倒入锥形瓶中，加入 1 mL 质量分数为 0.1 %刃天青溶液，此时液体呈蓝色；加热煮沸后，迅速用流水冷却，冷却时可用一次性 PE 手套和橡皮筋将锥形瓶瓶口密封好；然后通  $\text{CO}_2$  或  $\text{N}_2$  0.5~1 h，加入 L-半胱氨酸或 L-半胱氨酸盐酸盐 1 g，此时液体呈粉红或黄色；最后再次通气 10 min，密封小火加热 (不煮沸) 或密封静置 10-12 h 可观察到培养基变无色或淡黄色；将配制好的厌氧水，分装至密闭性良好的玻璃瓶中保存。

其中，刃天青溶液的制备方法为：称取 0.1 g 刃天青粉末，加蒸馏水定

容至 100 mL 4 °C 储存；刃天青是一种氧化还原指示剂，在缺氧环境下由粉红变为无色，能直观显示细菌培养过程是否达到厌氧标准；L-半胱氨酸或 L-半胱氨酸盐酸盐。L-半胱氨酸具有还原性，抗氧化性，能除去水中的氧气分子，降低培养基中的氧化还原电位，为厌氧细菌提供无氧环境。

- 5        步骤 1.2、厌氧培养基的制备：称取 38.5 g BHI 培养基至 1L 厌氧水中，厌氧水持续通入 CO<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> 保持其厌氧状态；用玻璃棒快速搅拌，使 BHI 培养基完全溶解；取厌氧滚管通入 CO<sub>2</sub> 或 N<sub>2</sub> 以排出空气，后用 5 mL 移液枪移取 9 mL BHI 培养基至厌氧管中，保持通气 30 s，迅速塞上丁基橡胶塞，打好铝盖，制备得到厌氧 BHI 液体培养基；在制备好的 BHI 液体培养基中加  
10        入 0.75~1.5 % 琼脂制成 BHI 固体培养基培养基，分装至厌氧瓶中；将分装好的无氧培养基 121 °C 高压灭菌 20 min，制备得到厌氧 BHI 固体培养基；

其中，BHI 培养基的组成为：1 L 固体 BHI 培养基成分为 10 g 胰蛋白胍、17.5 g 牛心浸粉、5 g 氯化钠、2 g 葡萄糖，2.5 g 磷酸氢二钠 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)，pH 值 7.4 ± 0.2，25 °C，加蒸馏水定容至 1 L、121 °C、20 min 灭菌。

- 15        步骤 1.3、*Akkermansia muciniphila* 的复活培养：将保存在冻存管或厌氧管中的菌种从 -80 °C 冰箱中取出，插入冰中解冻，然后按 20 % 的比例接种至上述制备好的厌氧 BHI 液体培养基，37 °C、180 r/m 震荡培养 18-24 h。

- 20        步骤 1.4、细菌生长曲线测定：吸取 10 mL 上述复苏菌液接种至 90 mL 装有厌氧 BHI 液体培养基的厌氧瓶中，37 °C、180 r/m 震荡培养；以未接种的厌氧 BHI 液体培养基为空白对照，从 0 h 起，每隔 2 h 测定 OD<sub>600nm</sub> 值，取样至 48 h，每次取样均做 3 个平行；以 OD<sub>600nm</sub> 值为纵坐标，培养时间为横坐标，绘制得到一条平滑的 S 型生长曲线，如图 1A 所示；

步骤 2、采用平板计数法测定菌液浓度：

- 25        步骤 2.1、平板培养基制备：将步骤 1.2 中灭菌后的装有厌氧 BHI 固体培养基培养基的厌氧瓶冷却至 45-50 °C，用酒精喷洒或擦拭后，与带盖平皿一起放入厌氧工作站，打开站内紫外灯灭菌 30 min；将平皿盖子稍稍打开，倒入培养基，盖好盖子，轻轻晃动，不要能沾到盖子上，静置 1 h，使培养基完全凝固且散干水分，判断方式为平板平整、无凸起、无“挂壁”。平板培养基的凝固方法有两种，其一是将平板逐个摊开凝固；其二是将几个平板叠

在一起凝固。前者凝固速度较快，在室温较高时采用；后者凝固速度较慢，可在室温较低时采用，其优点是形成凝固水少，尤其适用于平板划线等。

5 步骤 2.2、菌液光密度测定：在厌氧工作站中，取生长平台期的菌液，用步骤 1.2 中制备好的无氧 BHI 液体培养基作为稀释液，按 2 倍稀释得到 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 的菌液，每次取样后，用涡旋仪震荡 20 s 以充分混匀，后用高压灭菌过的移液枪快速加样，加完原液后再加相应体积的 BHI 培养基；用分光光度计测定上述 6 个不同稀释梯度菌液的  $OD_{600nm}$  值，每个稀释梯度做 3 个平行，如图 1B 所示。

10 步骤 2.3、稀释涂布法测菌液浓度：在厌氧工作站中，取原液以及 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32 稀释梯度的菌液，进行 10 倍梯度稀释；用于接种的稀释梯度一般为  $10^{-6}$ ~ $10^{-8}$ ，每个稀释梯度做 3 个平行。用涡旋仪充分震荡后，迅速取 100  $\mu$ L 菌液，接种到步骤 2.1 中制备好的 BHI 平板上并用涂布棒涂布均匀；接种完后，放置 10-30 min，待菌液被完全吸收后，倒置平板，放入厌氧罐和厌氧产气袋或厌氧工作站，37  $^{\circ}$ C 培养 24-48 h 后对菌落进行计  
15 数；若没有厌氧罐，用 PP 密封盒或将平板放置在真空袋中，用食品真空机抽去多余气体，构成厌氧环境。

步骤 2.4、菌落计数：选取菌落数在 30~300 的平板，利用拍照后使用 Windows 自带画图软件和鼠标计数器软件 WinOMeter V1.5 (张哲, 杨峰, 李新圃, 等. (2016) 基于 Photoshop 和计数软件精准计数平板上菌落的新方法.  
20 微生物学通报, 7: 1646-1648.) 手动计数，并计算每毫升菌液中的菌落数。

其中，平板涂布的方式并不会对菌落数造成太大影响，但平板培养基的放置时间会对菌落数产生影响，放置时间超过 12 h 可能导致菌落数偏差较大。

25 步骤 3、确定菌液浓度与光密度值的关系：以  $OD_{600nm}$  值为横坐标 (X)，菌液浓度为纵坐标 (Y)，用 Excel 或 Origin 8 绘制 XY 散点图，通过线性拟合得出二者的回归曲线，观察二者是否存在线性关系；如图 1C 所示；得到一条 *Akkermansia muciniphila*  $OD$  值与菌落数的线性方程，作为为后续细胞实验确定细菌添加量的依据。

步骤 4、将准确计数的微生物接种至提前培养的肠上皮细胞系：

步骤 4.1、猪肠上皮细胞的传代培养：于 37 °C 复苏猪空肠细胞系 (IPEC-J2)，利用 DMEM/F12 完全培养基在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 48 h，正常传代 3 次以后方可进行正式实验。

5 其中，DMEM/F12 完全培养基的组成为：在 DMEM/F12 基础培养基的基础上加入 10 % FBS, 5 ng/mL EGF, 10 U/mL HEPES, 1 % 双抗。

步骤 4.2、在获得可用的 IPEC-J2 细胞后，首先用胰酶将培养瓶中的 IPEC-J2 消化，然后按照  $1 \times 10^5$  个细胞/孔的剂量将细胞接种在 12 孔板中，利用不含抗生素 (双抗) 的 DMEM/F12 完全培养基 37 °C 培养 24 h 用于后续的细菌共培养实验。

10 步骤 4.3、提前取出 -80 °C 冻存的 *Akkermansia muciniphila* 进行扩大培养，18 h 后测定其 OD 值，利用步骤 3 建立的标准曲线计算细菌数量。

步骤 4.4、将含有 *Akkermansia muciniphila* 的培养液于 3000-5000 rpm 离心 5 分钟，去除上清，用不含抗生素的 DMEM/F12 培养基重悬备用。

15 步骤 4.5、按照 MOI=10 的剂量将 *Akkermansia muciniphila* 接种至步骤 4.2 中的 IPEC-J2 细胞，置于 37 °C 培养，取样和培养时间视具体情况而定。

步骤 5、利用倒置显微镜进行形态学观察，判断 *Akkermansia muciniphila* 与 IPEC-J2 的共培养情况，检测细菌与细胞是否正常生长，如图 2 所示，*Akkermansia muciniphila* 与 IPEC-J2 细胞共培养 24h 后，细胞间的连接更加紧密，细胞间的空泡更少。

20 步骤 6、利用 qPCR 技术检测 IPEC-J2 与 *Akkermansia muciniphila* 共培养后紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin, Claudin-1 的基因表达，检测 *Akkermansia muciniphila* 是否对肠道上皮细胞的紧密连接有影响。

25 如图 3 所示，通过倒置显微镜镜检发现，IPEC-J2 细胞与 *Akkermansia muciniphila* 共培养 24h 后，细胞间的连接更加紧密，细胞间的空泡更少；同时，采用 real-time PCR 方法检测紧密连接蛋白的基因表达量发现，*Akkermansia muciniphila* 极显著提高 IPEC-J2 细胞中紧密连接 Claudin-1 的 mRNA 表达量。因此，我们建立的共培养方法证实 *Akkermansia muciniphila* 可增强猪空肠上皮细胞的物理屏障功能，从而降低细胞通透性，有利于猪的



肠道健康。

在上述的方法中，对于厌氧菌而言，所有操作过程须高度重视厌氧和无菌，紫外灯须提前 0.5~1 h 打开；对于在实验操作过程中需放入厌氧工作站的物品，提前用 75 %酒精喷洒表面后再迅速放入站内，可增强灭菌效果。

- 5 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例，但如前所述，应当理解发明并非局限于本文所披露的形式，不应看作是对其他实施例的排除，而可用于各种其他组合、修改和环境，并能够在本文所述发明构想范围内，通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围，则都应在发明所附权利要求的保护范围内。