



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113337428 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 202110619723.X

C12R 1/25 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.03

(83) 生物保藏信息

GDMCC NO:61552 2021.03.09

(71) 申请人 海南大学

地址 570100 海南省海口市人民大道58号

(72) 发明人 张家超 伍雨晴 张增 彭倩楠

姜帅铭 马臣臣 霍冬雪

(74) 专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司

公司 31253

代理人 龙凯

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

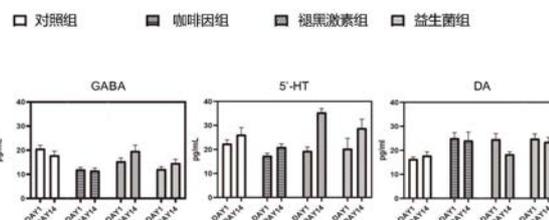
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一株植物乳杆菌HNU082及其用途

(57) 摘要

本发明属于微生物技术领域,具体公开了一株植物乳杆菌HNU082及其用途。该菌株已于2021年3月9日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:61552,保藏地址:中国广州市先烈中路一百号省微生物所实验楼五楼,分类学命名:植物乳杆菌(Lactiplantibacillus plantarum);该菌株菌落称白色,直径0.1-0.2cm,表面光滑、湿润、隆起,边缘齐整,在光学显微镜下观察,呈杆状;该植物乳杆菌HNU082通过改变肠道微生物群落结构,进一步地,增加γ-氨基丁酸和5-羟色胺的分泌,减少多巴胺的分泌,从而调节神经递质的分泌,以此来改善大脑神经递质分泌障碍这一情况,能够避免长期服用精神性药物带的耐药性和副作用;因此在制备治疗治疗大脑神经递质分泌障碍药物中有一定的应用前景。



1. 一株植物乳杆菌 HNU082, 其特征在于, 分类学命名为植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*), 其保藏编号为 GDMCC NO:61552。

2. 如权利要求1所述的植物乳杆菌 HNU082 在制备治疗大脑神经递质分泌障碍药物中的用途。

3. 如权利要求2所述的植物乳杆菌 HNU082 在制备治疗大脑神经递质分泌障碍药物中的用途, 其特征在于, 所述神经递质为  $\gamma$ -氨基丁酸。

4. 如权利要求2所述的植物乳杆菌 HNU082 在制备治疗大脑神经递质分泌障碍药物中的用途, 其特征在于, 所述神经递质为多巴胺。

5. 如权利要求2所述的植物乳杆菌 HNU082 在制备治疗大脑神经递质分泌障碍药物中的用途, 其特征在于, 所述神经递质为5-羟色胺。

## 一株植物乳杆菌HNU082及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一株植物乳杆菌HNU082及其用途。

### 背景技术

[0002] 肠道不仅是人体消化吸收的重要场所,同时也是最大的免疫器官,在维持正常免疫防御功能中发挥着极其重要的作用。人体肠道为微生物提供了良好的栖息环境,成人肠道内的微生物数量高达 $10^{14}$ 。作为人体最庞大、最复杂的微生物生态系统,肠道微生物本身及其代谢产物不仅能够调节人体健康,更在膳食和宿主之间起到了重要的桥梁作用。肠道微生物是人体代谢的重要参与者,为人类代谢过程提供底物、酶和能量;同时代谢产生的脂肪酸等促进人体上皮细胞生长和分化,并参与维生素的合成和各种离子的吸收,由于肠道是人体最大的免疫器官,肠道微生物与宿主在肠道黏膜表面的交流促进了免疫系统的建立和发展,成为人体重要的免疫屏障。正常情况下,肠道正常菌群与人体内外环境始终维持着动态的平衡,一旦这种平衡被打破,将发生肠道微生物的失调,进而导致包括消化系统疾病、代谢疾病等在内的各种疾病的发生。

[0003] 神经递质的分泌与人类精神状态和健康息息相关,当大脑神经递质分泌障碍时会引发免疫疾病、睡眠障碍、内分泌混乱、神经衰弱等多种疾病,研究表明,益生菌可以改变大脑中神经递质的分泌,从而影响人类的精神状态。人们发现双歧杆菌可以调节多囊卵巢综合征患者性激素的分泌,从而减轻患者的症状。

[0004] 脑肠轴即肠道-大脑轴,是指肠道微生物群和中枢神经系统(CNS)在特定神经、激素和免疫水平上的相互作用。临床研究表明,肠道微生物通过多种途径与大脑沟通,包括神经(突触传递)、内分泌和免疫途径。肠道细菌能产生短链脂肪酸(SCFAs)并合成许多激素和大脑神经递质,从而影响大脑功能和宿主行为,即大脑功能可以通过肠道-大脑轴被微生物改变,这些微生物不仅包括病原菌,还包括益生菌。益生菌干预治疗已成为缓解情绪障碍的最新策略之一,但其基本作用机制尚未得到很好的阐明。益生菌在缓解神经系统疾病方面的有益效果也表明了微生物群在这些疾病中的作用。

[0005] 植物乳杆菌是一种重要的益生菌,中国专利文献CN201210552498.3报道了一株具有高产 $\gamma$ -氨基丁酸能力的植物乳杆菌菌株, $\gamma$ -氨基丁酸是一种重要的抑制性神经递质,具有很高的生理活性,有调节血压、促使精神安定、促进脑部血流、营养神经细胞、增加生长激素分泌、改善更年期综合症等多种功效,但该菌株只能产生单一的神经递质,在神经递质分泌障碍疾病治疗中的应用有一定的局限性。另外,市面上对于大脑神经递质分泌障碍的药物主要是西药,西药的过多使用容易产生副作用以及耐药性。

### 发明内容

[0006] 针对以上现有技术中的不足,本发明提供了一株植物乳杆菌HNU082及其用途,通过植物乳杆菌HNU082改变肠道微生物群落结构,进一步地,增加 $\lambda$ -氨基丁酸和5-羟色胺的分泌,减少多巴胺的分泌,从而调节神经递质的分泌,以此来改善大脑神经递质分泌障碍这

一情况,能够避免长期服用精神性药物带的耐药性和副作用。

[0007] 为解决现有技术中的问题,本发明是通过如下技术方案实现:

[0008] 本发明提供一株植物乳杆菌HNU082,该菌株已于2021年3月9日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:61552,保藏地址:中国广州市先烈中路一百号省微生物所实验楼五楼,分类学命名:植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。

[0009] 植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) HNU082在MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,菌落称白色,直径0.1-0.2cm,表面光滑、湿润、隆起,边缘齐整,在光学显微镜下观察,呈杆状;扩增的16S rDNA由1474bp组成,同源比对分析发现,HNU082与*Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917(T)的序列相似性为99.80%,与*Lactiplantibacillus fabifermentans* DSM 21115(T)的序列相似性为98.91%,与*Lactiplantibacillus songbeiensis* 398-2(T)的序列相似性为98.40%。进化树分析显示HNU082与*Lactiplantibacillus plantarum*聚集在同一分支,所述的植物乳杆菌HNU082的16S rDNA的序列如SEQ ID NO:1所示,基于细胞形态、16S rDNA测序比对分析可知,HNU082归属于植物乳杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)。

[0010] 本发明提供一株植物乳杆菌HNU082在制备治疗大脑神经递质分泌障碍药物中的用途。

[0011] 进一步地,所述神经递质为 $\gamma$ -氨基丁酸。

[0012] 进一步地,所述神经递质为多巴胺。

[0013] 进一步地,所述神经递质为5-羟色胺。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0015] 1) 本发明通过大批量的筛选得到一株植物乳杆菌HNU082,该植物乳杆菌HNU082通过改变肠道微生物群落结构,进一步地,增加 $\lambda$ -氨基丁酸和5-羟色胺的分泌,减少多巴胺的分泌,从而调节神经递质的分泌,以此来改善大脑神经递质分泌障碍这一情况,能够避免长期服用精神性药物带的耐药性和副作用。

[0016] 2) 本发明筛选得到的植物乳杆菌HNU082能较好的改善大脑神经递质分泌障碍,因此,该菌株在制备治疗治疗大脑神经递质分泌障碍药物中有一定的应用前景。

## 附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0018] 图1为菌株HNU082菌落形态图;

[0019] 图2为菌株HNU082系统进化树,*Secundilactobacillus silagei* JCM19001作为外群;

[0020] 图3为菌株HNU082调节神经递质分泌结果图。

### 具体实施方式

[0021] 下面将结合具体实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0022] 本发明实施例中涉及到的培养基配方及试剂组分如下:

[0023] MRS肉汤培养基:蛋白胨10g,牛肉膏粉8g,酵母膏粉4g,葡萄糖20g,磷酸氢二钾(无水)2g,柠檬酸三氨(无水)2g,乙酸钠(含三水)5g,硫酸镁(七水)0.2g,硫酸锰(含四水)0.05g,吐温-80 1g,蒸馏水定容至1L,调节pH至 $6.2 \pm 0.2$ ,121℃高压灭菌15min。

[0024] TYG液体培养基:胰蛋白胨5g,酵母膏5g,葡萄糖10g,丁二酸钠5g,调节pH至6.5,蒸馏水定容至1L,121℃高压灭菌15min。

[0025] MRS琼脂培养基:在MRS肉汤培养基的基础上加入2%琼脂。

[0026] 其他常规试剂和设备,如无特别说明,均可市售获得。

[0027] 实施例1植物乳杆菌HNU082筛选及鉴定

[0028] 初筛:从中国海南省不同地区(包括东线地区:万宁,文昌,琼海,陵水;西线地区:临高,东方,昌江,白沙;中线地区:琼中,五指山)农贸市场共采集36份发酵蔬菜样品,准确称取10g发酵蔬菜汁于90mL无菌NaCl溶液(0.85%,W/V)中混合,采用10倍稀释法制备梯度为 $10^{-1}$ - $10^{-5}$ 的样品稀释液,取 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 浓度梯度稀释液各100 $\mu$ L分别涂布于MRS琼脂培养基上,37℃厌氧培养48h,经过多次分离纯化培养,得到29株初筛菌株。

[0029] 复筛:对上述29株初筛菌株进行耐酸、耐胆盐性能测定,进一步筛选出耐受力强的菌株。菌株的耐酸能力测定方法如下:用1mol/L的HCl调节MRS肉汤培养基至pH值分别为2.5、3.5,将活化好的菌株按3% (V/V) 接种量分别接种于不同pH值的MRS肉汤培养基中,37℃培养4h,10倍梯度稀释后涂布于MRS琼脂培养基上,计数,测定其中的活菌数,计算存活率,同时设置空白对照,结果见表1;菌株的耐胆盐能力测定方法如下:制备含0.3%、0.4%、0.5% (V/V) 牛胆盐的MRS肉汤培养基中,37℃培养4h,10倍梯度稀释后涂布于MRS琼脂培养基上,计数,测定其中的活菌数,计算存活率,同时设置空白对照,结果见表2:

[0030] 表1不同pH下菌株的存活率

菌株	存活率 (%)		菌株	存活率 (%)	
	pH=2.5	pH=3.5		pH=2.5	pH=3.5
M6-4	84.50	100	R19-1	26.60	36.40
R1-2	75.30	99.10	M21-2	55.20	35.80
M7-1	85.10	81.30	R18-2	28.5	33.90
R21-4	83.80	72.20	M19-3	26.70	28.90
RE-3	72.10	67.30	M1-3	20.80	26.20
M20-6	62.40	65.10	R9-5	16.10	25.00
R21-3	52.60	59.60	R22-2	18.60	24.60

[0031]

[0032]	RD-1	50.80	56.50	M20-5	17.60	24.50
	HNU082	42.00	51.90	R26-4	20.10	24.40
	RB-3	42.40	51.70	R21-2	15.30	20.70
	R21-1	48.50	49.80	R27-1	14.80	19.40
	R4-3	42.20	49.40	M3-5	17.80	19.30
	R22-1	41.30	47.70	M9-4	15.00	18.80
	R25-3	45.50	46.80	R5-2	13.90	16.80
	R9-7	33.20	43.00			

[0033] 表2不同胆盐浓度下菌株的存活率

菌株	存活率 (%)			菌株	存活率 (%)		
	0.3%	0.4%	0.5%		0.3%	0.4%	0.5%
HNU082	36.9	23.4	23.1	M19-3	1	0.6	0.5
M20-6	22.3	17.4	10.8	RD-1	6.4	1.9	0.3
M7-1	53.5	19.5	9.9	R22-2	19.3	0.1	0.2
R27-1	10.6	6.4	5.8	M9-4	1.4	1.6	0.2
RB-3	25.4	21.5	5.7	M1-3	0.4	0.2	0.2
M20-5	4.5	10.9	4.4	R22-1	2.2	1	0.2
R26-4	6.4	4.3	3.9	R19-1	1	0.4	0.2
R21-1	16.8	4.7	3	M6-4	0.1	0	0.1
M3-5	5.3	4.7	2.5	R25-3	0.2	0	0.1
R1-2	4.7	4.3	2.1	R4-3	0.6	0	0
R21-3	5.4	1.3	1.7	RE-3	3.7	0.2	0
R5-2	14.3	32.9	1.5	R21-4	0.2	0	0
M21-1	2.3	1.5	0.9	R18-2	0.1	0	0
R21-2	1	0.9	0.7	R9-7	1.2	0.3	0
R9-5	1.1	0.7	0.5				

[0035] 从表1和表2的结果可以看出,随着环境中pH值的降低,各菌株的酸耐受能力逐渐降低,随着胆盐浓度的逐步增加,各菌株的存活率也显著下降。综合耐酸、耐胆盐性能来看,HNU082菌株在0.3%、0.4%、0.5%胆盐浓度下的存活率分别能够达到36.9%、23.4%、23.1%,在pH=2.5、pH=3.5的环境下存活率能够达到42%、51.9%,表明HNU082菌株具有良好的耐受性。

[0036] 菌株形态学观察:将纯化的HNU082菌株接种于MRS肉汤培养基过夜活化,涂布于MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,观察菌落的表面形态。

[0037] 分子生物学鉴定:对HNU082菌株的16S rRNA基因进行测序,具体如下:以HNU082菌株的基因组DNA为模板,通用引物27F和1492R扩增16S rDNA序列,纯化后插入到pMD18-T载体(Takara),转化到E.coli DH5 $\alpha$ ,得到阳性克隆送上海美吉生物医药科技有限公司测序,将测序得到的序列与在线软件,将测序得到的序列与在线软件EzBioCloud's Identify Service模块的EzTaxon-e(<http://www.ezbiocloud.net/identify>)中细菌数据库序列进

行同源比对分析,使用MEGA6.5软件,以N-J法进行聚类分析和系统进化树的构建,重复取样1000次,并且运用自展(Bootstrap)法检验所计算的进化树拓扑结构稳定性,发育树节点只显示Bootstrap值大于50%数值,上标的“T”表示模式菌株。

[0038] 引物序列如下:

[0039] 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(SEQ ID NO.2);

[0040] 1492R:R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO.3)

[0041] HNU082菌株具体鉴定信息如下:

[0042] 形态特征:在MRS琼脂培养基上,37℃培养24h,菌落称白色,直径0.1-0.2cm,表面光滑、湿润、隆起,边缘齐整,在光学显微镜下观察,呈杆状,见图1。

[0043] 16s rDNA测序:扩增的16s rDNA由1474bp组成,同源比对分析发现,HNU082与Lactiplantibacillus plantarum ATCC 14917(T)的序列相似性为99.80%,与Lactiplantibacillus fabifermentans DSM 21115(T)的序列相似性为98.91%,与Lactiplantibacillus songbeiensis 398-2(T)的序列相似性为98.40%。进化树分析显示HNU082与Lactiplantibacillus plantarum聚集在同一分支,见图2。所述的植物乳杆菌HNU082的16S rDNA的序列如SEQ ID NO:1所示。

[0044] 基于细胞形态、16S rDNA测序比对分析可知,HNU082归属于植物乳杆菌(Lactiplantibacillus plantarum)。

[0045] 实施例2植物乳杆菌HNU082产 $\lambda$ -氨基丁酸能力的测定

[0046] 将分离得到的植物乳杆菌HNU082接种于MRS肉汤培养基中,置于180r/min,34℃恒温振荡培养箱中,培养8~12h;将上述培养液按2%的接种量接种到装有100mL TYG液体培养基的三角瓶中,置于180r/min,34℃恒温振荡培养箱中培养2d,制得发酵液。

[0047] 发酵液中 $\lambda$ -氨基丁酸含量的测定采用高效液相色谱法,具体方法参考文献(吴蓉,周玮,何慧园.高效液相色谱法测定固体饮料中 $\gamma$ -氨基丁酸含量[J].食品工程,2016,000(004):59-63.);取离心后发酵液的上清50 $\mu$ L,加入150 $\mu$ L0.4mol/L硼酸缓冲液和300 $\mu$ L1.5mg/mL的DNS衍生液,漩涡混匀,静置反应2min后,过孔径0.22 $\mu$ m滤膜,取10 $\mu$ L溶液进行上样分析,高效液相色谱购自美国Waters公司,具体液相色谱条件如下:

[0048] 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C18(4.6mm $\times$ 150mm,5 $\mu$ m);流动相:流动相A为25mmol/L的乙酸钠溶液,用2%的醋酸调pH值至6.0 $\pm$ 0.2;流动相B为乙腈;等度洗脱,其中A:B=68:32,流速1mL/min,柱温30℃,进样量10 $\mu$ L,检测波长216nm。

[0049] 液相检测结果可知,发酵液上清中的 $\gamma$ -氨基丁酸含量216mg/L,表明植物乳杆菌HNU082具有高产 $\gamma$ -氨基丁酸的能力。

[0050] 实施例3植物乳杆菌HNU082调节神经递质的分泌

[0051] 为了验证植物乳杆菌HNU082能调节神经递质的分泌,发明人通过咖啡因诱导建立了斑马鱼(购自购自中国斑马鱼资源中心)大脑神经递质分泌障碍模型,研究不同处理(空白对照、咖啡因组,褪黑素组,益生菌组)对斑马鱼头部神经递质分泌的影响,测定了每组中与神经过度活动相关的神经递质的水平,并测定了不同处理(空白对照、咖啡因组,褪黑素组,益生菌组)对这些神经递质分泌障碍疾病的改善效果。

[0052] 其中,神经递质包括 $\lambda$ -氨基丁酸(GABA)、多巴胺(DA)和5-羟色胺(5-HT), $\gamma$ -氨基丁酸和5-羟色胺含量的增加能改善神经递质分泌障碍,多巴胺含量减少也能改善神经递质

分泌障碍。

[0053] 本次实验中共有360条斑马鱼,每个鱼缸中放15条鱼,将鱼平均分配到24个鱼缸中,这24个鱼缸被随机分配到四组进行实验:

[0054] (1) 空白对照组:正常饲养,定期换水;

[0055] (2) 咖啡因组:连续两天向水中加入200 $\mu$ M咖啡因建立斑马鱼的大脑神经递质分泌障碍模型,随后,正常饲养,定期换水;

[0056] (3) 褪黑激素组:连续两天使用200 $\mu$ M咖啡因建立斑马鱼的大脑神经递质分泌障碍模型,随后加入含有1 $\mu$ M褪黑激素的溶液(褪黑激素粉溶于无水乙醇至100mM,最终稀释至最终浓度为1 $\mu$ M),正常饲养,定期换水;

[0057] (4) 益生菌组:连续两天使用200 $\mu$ M咖啡因建立斑马鱼的大脑神经递质分泌障碍模型,随后每天加入含有 $10^8$ CFU植物乳杆菌HNU082/g药物制剂饲养,定期换水。

[0058] 其中,褪黑激素能改善神经递质分泌障碍。

[0059] 在咖啡因诱导后的第1天和第14天,收集每只斑马鱼的脑和肠,测定每只斑马鱼中神经递质分泌水平,结果如图3所示。

[0060] 由图3中可以看出,与空白对照组相比,在第1天,咖啡因组、褪黑素组和益生菌组的多巴胺浓度显著升高,而 $\gamma$ -氨基丁酸浓度降低,5-羟色胺浓度与对照组相比无显著变化,这种不平衡表明咖啡因已经成功地诱导了斑马鱼大脑中的神经递质分泌障碍;经过不同实验组14天的平等治疗,各组的神经递质水平发生了变化,褪黑素组多巴胺水平逐渐恢复正常(降低),褪黑素组和益生菌组的 $\gamma$ -氨基丁酸水平明显高于对照组( $p=0.045$ ),褪黑素组的5-羟色胺浓度明显高于其余三组的平均水平( $p=0.016$ ),结果表明斑马鱼在摄入益生菌和褪黑素14天后, $\gamma$ -氨基丁酸和5-羟色胺含量的增加,其能改善神经递质分泌障碍,多巴胺含量减少,其也能改善神经递质分泌障碍。

[0061] 因此,植物乳杆菌HNU082通过在斑马鱼体内增加 $\gamma$ -氨基丁酸和5-羟色胺含量,并减少多巴胺含量,从而改善斑马鱼大脑神经递质分泌障碍。

[0062] 以上实施例,仅为本发明的具体实施方式,用以说明本发明的技术方案,而非对其限制,本发明的保护范围并不局限于此,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,其依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改或可轻易想到变化,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改、变化或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明实施例技术方案的精神和范围,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

## 序列表

&lt;110&gt; 海南大学

&lt;120&gt; 一株植物乳杆菌HNU082及其用途

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1474

&lt;212&gt; DNA

<213> 植物乳杆菌 (*Lactiplantibacillus plantarum*)

&lt;400&gt; 1

```

gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgaactct ggtattgatt ggtgcttgca 60
tcatgattta catttgagtg agtggcgaac tggtagtaa cacgtgggaa acctgcccag 120
aagcggggga taacacctgg aacagatgc taataccgca taacaacttg gaccgcatgg 180
tccgagtttg aaagatggct tcggctatca cttttgatg gtcccgcggc gtattagcta 240
gatggtgggg taacggctca ccatggcaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg 300
ccacattggg actgagacac ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc 360
acaatggacg aaagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgt 420
aaactctggt gtaaagaag aacatatctg agagtaactg ttcaggtatt gacggtat 480
aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccacgg taatacgtag gtggcaagcg 540
ttgtccggat ttattgggcg taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag 600
ccttcggctc aaccgaagaa gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtgca gaagaggaca 660
gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag 720
gcggtgtctt ggtctgtaac tgacgtgag gctcgaaagt atgggtagca aacaggatta 780
gataccctgg tagtccatac cgtaaacgat gaatgctaag tgttgagggg tttccgcct 840
tcagtgtgc agctaacgca ttaagcattc cgctgggga gtacggccgc aaggctgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggca tgtggtttaa ttcgaagcta 960
cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatac tatgcaaac taagagatta gacgttcct 1020
tcggggacat ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg cgatgttggg 1080
ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggactct 1140
ggtgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaac atcatgccc 1200
ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgag aactcgcgag 1260
agtaaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggattgt aggctgcaac tcgctacat 1320
gaagtcggaa tcgctagtaa tcgcgatca gcatgccgag gtgaatacgt tcccgggcct 1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgagagt ttgtaacacc caaagtcggt ggggtaacct 1440
tttaggaacc agccgcctaa ggtggacaga tgat 1474

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

tacggctacc ttgttacgac tt 22

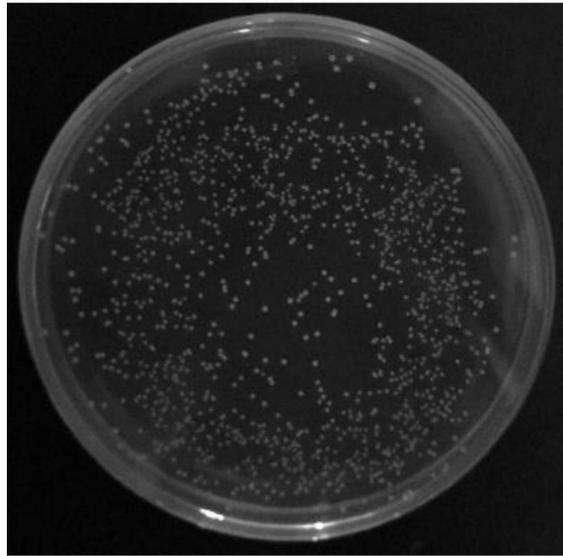


图1

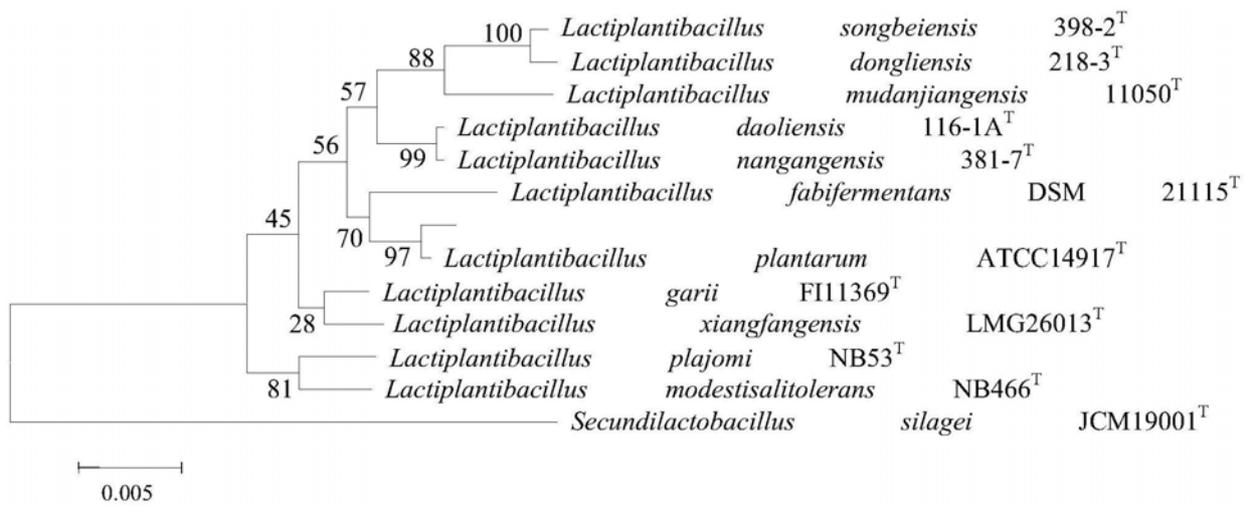


图2

□ 对照组      ▨ 咖啡因组      ▩ 褪黑激素组      ▤ 益生菌组

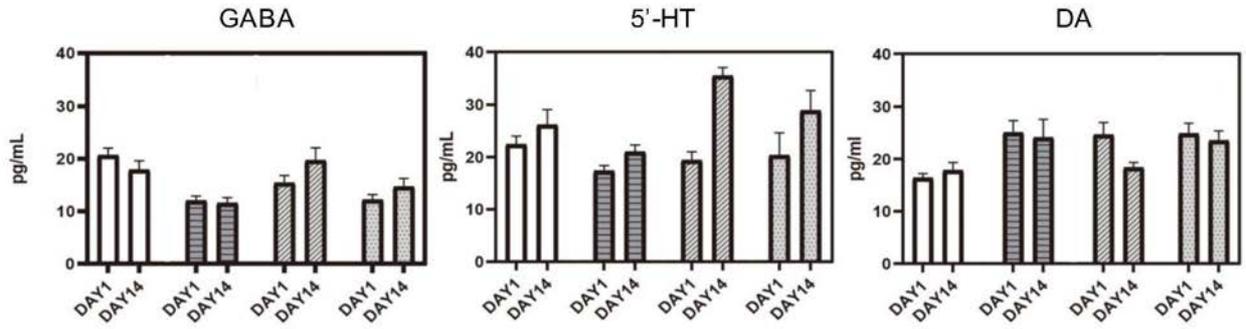


图3