



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 117965323 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 11

(21) 申请号 202410361686.0

(22) 申请日 2024.03.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 117965323 A

(43) 申请公布日 2024.05.03

(83) 生物保藏信息

GDMCC No:62464 2022.05.12

(73) 专利权人 无限极(中国)有限公司

地址 529156 广东省江门市新会区会城镇
七堡工贸城北区三号

专利权人 广东省科学院微生物研究所(广
东省微生物分析检测中心)

(72) 发明人 周勇 吴清平 蔡曼君 寇秀颖
刘远超 吴晓贤 胡惠萍 卓丽君
唐健 陶倩 谢意珍 张智

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

专利代理师 孙凤侠

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

A23L 2/39 (2006.01)

A23L 31/00 (2016.01)

A23L 33/125 (2016.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111892663 A, 2020.11.06

CN 117624397 A, 2024.03.01

CN 102396346 A, 2012.04.04

CN 108575556 A, 2018.09.28

CN 105902597 A, 2016.08.31

CN 102731365 A, 2012.10.17

JP 2005179302 A, 2005.07.07

JP 2006129743 A, 2006.05.25

KR 20160121886 A, 2016.10.21

WO 2021144727 A1, 2021.07.22

WO 2024011771 A1, 2024.01.18

KR 20050079790 A, 2005.08.11 (续)

审查员 胡雨嘉

权利要求书1页 说明书15页

序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和应用。本发明从全国范围内广泛采集野生菌,通过系统选育获得猴头菇优质新菌株猴HE015,并于2022年05月12日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No: 62464。其遗传背景与现有猴头菇菌种明显不同,对于补充优质猴头菇栽培品种,满足市场需求,促进行业高质量发展,具有重要价值和意义。本发明还提供了用于检测鉴别猴HE015的特异性分子标记和快速检测方法。猴HE015母种菌丝密壮、原种发菌快、抗杂菌污染能力强,具有产量高、生

长周期短等优势,多糖含量较高,具有广阔的产业化前景。



CN 117965323 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

杨焱等.猴头菌子实体和固体培养菌丝体提取物化学组成及生物活性的比较.《菌物研究》.2006,第04卷(第03期),第15-19页.

杨焱等.猴头菌子实体和固体培养菌丝体提取物化学组成及生物活性的比较.《菌物研究》.2006,第04卷(第03期),第15-19页,特别是第15页右栏第1-10行、第18页左栏第6-12行、第18页右栏第6-7行,表3-4.

杜忠伟等.一株野生猴头菇生物学特性及农艺形状研究.《中国林副特产》.2020,(第01期),第19-20页.

段丹等.不同猴头菌菌株品质分析及优势菌株筛选.《食用菌学报》.2015,第22卷(第04期),第16-22页.

黄萍等.猴头菇多糖胃黏膜保护作用研究.《中药材》.2011,第34卷(第10期),第1588-1590页.

苏文英等.猴头菇菌株菌丝生长特性及栽培研究.《农业与技术》.2022,第42卷(第07期),第

19-23页.

安苗青等.不同方式制备的猴头菇提取物对大鼠急性胃黏膜损伤保护作用对比.《食品工业科技》.2021,第43卷(第02期),第360-367.

Chen W等.Pre-protective effect of polysaccharides purified from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats.《Int J Biol Macromol》.2020,第159卷第948-956页.

Wang XY等.Gastroprotective activity of polysaccharide from *Hericium erinaceus* against ethanol-induced gastric mucosal lesion and pylorus ligation-induced gastric ulcer, and its antioxidant activities.《Carbohydr Polym》.2018,第186卷第100-109页.

Hou C等.Structural characterization of two *Hericium erinaceus* polysaccharides and their protective effects on the alcohol-induced gastric mucosal injury.《Food Chem》.2021,第375卷第1-8页.

1. 一种猴头菇 (*Hericium erinaceus*) 新菌株猴HE015, 其特征在于, 该菌株于2022年05月12日保藏于广东省微生物菌种保藏中心, 保藏编号为GDMCC No:62464。
2. 一种猴头菇菌剂, 其特征在于, 含有权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015。
3. 一种用于检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的分子标记, 其特征在于, 所述分子标记为:
核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示的分子标记;
或核苷酸序列如SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示的分子标记组合。
4. 检测权利要求3所述分子标记的试剂在制备检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的试剂盒中的应用。
5. 一种用于检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的引物, 其特征在于, 所述引物为引物对HE015-F8/R8, 或引物对HE015-F2/R2和引物对HE015-F4/R4的组合;
所述引物对HE015-F8/R8的核苷酸序列如SEQ ID NO.8-9所示,
所述引物对HE015-F2/R2的核苷酸序列如SEQ ID NO.4-5所示,
所述引物对HE015-F4/R4的核苷酸序列如SEQ ID NO.6-7所示。
6. 一种用于检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的试剂盒, 其特征在于, 含有检测权利要求3所述分子标记的试剂。
7. 一种用于检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的试剂盒, 其特征在于, 含有权利要求5所述引物。
8. 一种检测或鉴定权利要求1所述猴头菇新菌株猴HE015的方法, 其特征在于, 以待测样品DNA为模板, 利用权利要求6或7所述试剂盒进行检测。

一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物食用菌技术领域。具体地,涉及一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记,以及猴HE015提取物及应用。

背景技术

[0002] 猴头菌 [*Hericium erinaceus* (Bull. ex Fr.) Pers.], 又称猴头菇、猴头蘑、猴菇、刺猬菌, 属于真菌界、担子菌门、担子菌纲、红菇目、猴头菌科、猴头菌属。猴头菇是一种兼具食、药用价值的名贵食用菌, 食用历史悠久, 素有“山珍猴头, 海味燕窝”之称, 含有多种营养成分。传统医学认为, 猴头菇性平、味甘, 助消化、利五脏; 具有健胃、补虚、抗癌、益肾精之功效, 是治疗消化系统疾病和抑制胃痛的良药。实验证明, 猴头菇多糖具有增强免疫力、抑制消化系统肿瘤、抗胃溃疡、降血糖等功效。

[0003] 种质资源是产业发展的基础, 然而, 与香菇 (*Lentinusedodes*)、平菇 (*Pleurotus ostreatus*) 等大宗食用菌种类相比, 目前猴头菇菌种质资源储备较少、栽培品种少, 大部分新品种是通过诱变育种、杂交育种等方式选育而来, 遗传背景相似, 新菌株与出发菌株或亲本大部分性状相似。而且, 猴头菇早期主要是以鲜品、干品方式销售, 育种的目标性状多为菇形好、产量高等。由于产量与品质总是存在矛盾关系, 导致现有品种存在高产不优质或优质不高产的问题。另外, 在规模生产中, 菌种活力退化以及杂菌污染问题, 也是困扰猴头菇栽培产业的棘手问题, 会给栽培农户和企业带来很大经济损失。

[0004] 近年来, 随着猴头菇深加工产业的发展, 对优质猴头菇的需求量不断增长, 急需选育出产量高、生产周期短、抗杂菌污染能力强、活性成分含量高的优质新种质, 以满足猴头菇深加工产业的需求, 提升企业生产效益。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供优质猴头菇新菌株。本发明人团队经过大量调查研究, 从内蒙古阿尔山的野生猴头菇样本上分离纯化获得一株猴头菇优质品种, 该猴头菇品种与现有品种遗传背景差异较大, 该猴头菇品种母种菌丝密壮、原种发菌快、头茬菇采收时间短、抗杂菌污染能力强, 具有产量高、生长周期短且活性成分含量也较高等优势, 其提取物改善酒精性胃粘膜损伤效果显著。

[0006] 本发明的目的是提供一种猴头菇 (*Hericium erinaceus*) 新菌株猴HE015及其菌剂产品。

[0007] 本发明另一目的是提供所述猴HE015的特异分子标记及鉴定应用。

[0008] 本发明再一目的是提供所述猴HE015的提取物及其应用。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 本发明在全国范围内的26个省(自治区), 100多个自然保护区(森林公园)广泛采集野生菌, 在内蒙古、湖南、贵州、河南、黑龙江、山东等省(自治区)采集到野生猴头菇菌株, 通过系统选育获得一株高产且其子实体多糖对酒精慢性胃粘膜损伤具有显著保护作用的

猴头菇新菌株猴HE015,该菌株产量高,生长周期短,提取物可以增加酒精慢性胃粘膜损伤小鼠的体重,减少酒精慢性胃粘膜损伤对小鼠体重的影响,改善酒精慢性胃粘膜损伤小鼠胃粘膜。

[0011] 因此,本发明提供如下应用方案:

[0012] 一种猴头菇(*Hericium erinaceus*)新菌株猴HE015,该菌株于2022年05月12日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:62464。

[0013] 一种含有上所述新菌株猴HE015的猴头菇菌剂。

[0014] 进一步地,所述猴头菇菌剂除含有猴HE015外,还可含有母种培养基。

[0015] 所述母种培养基可选PDA培养基,组成为:马铃薯200g/L,葡萄糖20g/L、琼脂20g/L,余量为水。

[0016] 一种用于检测或鉴定上述猴HE015的分子标记,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0017] 一种用于检测或鉴定上述猴HE015的分子标记组合,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示。

[0018] 利用上述分子标记或分子标记组合为靶标,可用于检测鉴别猴HE015,对猴HE015产业化后的质量控制具有重要意义。

[0019] 另外,检测上述分子标记或分子标记组合的试剂在制备猴HE015检测或鉴定试剂盒中的应用,以及含有检测上述分子标记或分子标记组合的试剂盒产品,也应在本发明保护范围之内。

[0020] 所述检测上述分子标记或分子标记组合的试剂,比如分子检测引物。

[0021] 具体地,作为可选择的优选方案之一,用于检测或鉴定猴HE015的引物如引物对HE015-F8/R8,

[0022] 作为可选择的优选方案之一,用于检测或鉴定猴HE015的引物如引物对HE015-F2/R2和引物对HE015-F4/R4的组合;

[0023] 所述引物对HE015-F8/R8的核苷酸序列如SEQ ID NO.8-9所示,

[0024] 所述引物对HE015-F2/R2的核苷酸序列如SEQ ID NO.4-5所示,

[0025] 所述引物对HE015-F4/R4的核苷酸序列如SEQ ID NO.6-7所示。

[0026] 基于此,本发明还提供一种检测或鉴定猴HE015的方法,是以待测样品DNA为模板,利用含有上述分子标记检测试剂的试剂盒进行检测。

[0027] 作为一种可选的优选实施方案,所述检测鉴定方法为分子鉴定技术,具体是以待测样品DNA为模板,利用上述引物进行PCR扩增。扩增结果为阳性鉴定为猴HE015。

[0028] 具体地,引物对HE015-F8/R8的扩增结果为阳性,则鉴定为猴HE015;

[0029] 或引物对HE015-F2/R2和引物对HE015-F4/R4的扩增结果均为阳性,则鉴定为猴HE015。

[0030] 进一步可选地,所述PCR扩增的反应体系为:2×Taq Master Mix 15μL,DNA 模板(50 ng/μL) 2μL,正向引物(10μmol/L) 1μL,反向引物(10μmol/L) 1μL,ddH₂O 11μL。

[0031] 所述PCR扩增的反应程序为:95℃预变性,95℃变性15 sec,58℃退火15sec,72℃延伸15sec,GOTOstep2,执行32个循环,72℃延伸10 min。

[0032] 我们研究数据显示,猴HE015不仅产量高、生长周期短,其提取物可以增加酒精慢

性胃粘膜损伤小鼠的体重,减少酒精慢性胃粘膜损伤对小鼠体重的影响,改善酒精慢性胃粘膜损伤小鼠胃粘膜,效果尤以子实体提取物效果更为显著。

[0033] 因此,本发明还提供猴头菇猴HE015多糖提取物,是由猴HE015的子实体经水提醇沉法所得的沉淀。

[0034] 本发明还提供猴头菇猴HE015小分子提取物,是由猴HE015的子实体经水提醇沉法所得的上清液。

[0035] 具体来说,作为可选方案,提取物的提取方法如下:

[0036] (1)猴HE015子实体粉碎后,加入10-30倍量水,90-99℃搅拌提取1-3h;过滤,滤液减压浓缩至相对密度至1-1.5,然后加入乙醇使醇浓度至70-90%,2-10℃静置12-48h;

[0037] (2)步骤(1)静置后的下层沉淀,用5倍水复溶,加乙醇调整醇浓度为70-90%,2-10℃静置12-48h;下层沉淀经70-90%乙醇、丙酮清洗后,冷冻干燥,粉碎后即得猴HE015子实体多糖提取物;

[0038] (3)步骤(1)静置后的上清液,经减压浓缩,冷冻干燥,粉碎后得猴HE015子实体小分子提取物。

[0039] 其中,更具体地的可选操作条件,步骤(1)为:猴HE015子实体粉碎后,加入20倍量纯水,95℃搅拌提取2h;过滤,滤液减压浓缩至相对密度至1.10,加入95%乙醇使醇浓度至80%,4℃静置24h。

[0040] 更具体地的可选操作条件,步骤(2)为:下层沉淀,用5倍纯水复溶,加95%乙醇调整醇浓度为80%,4℃静置24h;下层沉淀经80%乙醇、丙酮清洗后,冷冻干燥,粉碎后即得猴HE015子实体多糖提取物。

[0041] 在实际产业中,本发明的猴头菇优质新菌株猴HE015的栽培采用现有猴头菇栽培技术均可。

[0042] 本发明具有以下有益效果:

[0043] 本发明从全国范围内广泛采集野生菌,通过系统选育筛选获得一株产量高、生长周期短的猴头菇优质新菌株,猴HE015,其遗传背景与现有猴头菇菌种有明显不同,对于补充优质猴头菇栽培品种,以满足市场需求,提升企业发展空间,有重要价值和意义。

[0044] 我们研究数据显示,猴HE015母种菌丝密壮、原种发菌快、头茬菇采收时间短、抗杂菌污染能力强,具有产量高、生长周期短的优势,而且多糖等活性成分含量也较高。其提取物可以增加酒精慢性胃粘膜损伤小鼠的体重,减少酒精慢性胃粘膜损伤对小鼠体重的影响,改善酒精慢性胃粘膜损伤小鼠胃粘膜,效果尤以子实体提取物效果更为显著,具有广阔的产业化前景。

[0045] 同时,本发明提供了猴HE015的特异分子标记及检测产品,对于猴HE015的鉴别及相关产业的质量控制提供技术依据。

附图说明

[0046] 图1为新菌株猴HE015来源猴头菇标本照片(上)和生长环境照片(下)。

[0047] 图2为猴HE015驯化后子实体表型。

[0048] 图3为HE015-F8/R8引物对在猴HE015及市场种中的扩增结果图。

[0049] 图4为引物特异性扩增结果图;A:HE015-F4/R4引物多态性分析;B:HE015-F2/R2引

物多态性分析。

[0050] 图5为猴HE015提取物对慢性酒精性胃粘膜损伤小鼠体重(A)及生存曲线(B)的影响;Control:正常组;Model:模型组;Positive:阳性药组;HEF:猴HE015液体发酵培养物组;HEFP:猴HE015子实体多糖提取物组;HEFX:猴HE015子实体小分子提取物组;HESP:猴HE015固体培养菌丝体多糖提取物组;HESX:猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物组。

[0051] 图6为猴HE015提取物对慢性酒精性胃粘膜损伤病理学的影响。

具体实施方式

[0052] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。

[0053] 除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0054] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0055] 实施例中使用的加富综合PDA培养基:按质量分数计,包括马铃薯20%+葡萄糖2%+蛋白胨1%+琼脂2%+磷酸二氢钾0.3%+硫酸镁0.15%+维生素B₁0.001%,余量为水。其配制方法是:先将马铃薯洗净去皮,再称取200 g马铃薯切成小块,加水煮烂(煮沸20~30分钟,玻璃棒可戳破),用八层纱布过滤,滤液中加入葡萄糖20 g、蛋白胨10 g、琼脂20 g、磷酸二氢钾3 g、硫酸镁1.5 g、维生素B₁0.01 g,搅拌均匀,稍冷却后再补足水分至1000毫升,0.11 MPa、121℃高温高压湿热灭菌30 min。

[0056] 实施例中使用的母种培养基(PDA培养基):马铃薯200g/L,葡萄糖20g/L、琼脂20g/L,余量为水。其配制方法是:马铃薯去皮称取200g,切成小块放入锅中,加水1000mL,在电磁炉上加热煮沸,维持20-30min,用2层纱布过滤,弃渣,滤液补充至1000mL,滤液中加入葡萄糖20g、琼脂20g,小火加热,并用玻璃棒不断搅拌,防止琼脂糊底或溢出,待琼脂完全溶解后,再补充水分至所需。分装灭菌:固体培养基约为试管高度的1/5,分装时可用三角漏斗以免使培养基沾在管口或瓶口上造成污染。分装后加塞,7个试管一包扎,121℃灭菌20min,待温度降至80℃左右时,取出摆试管斜面。

[0057] 原种培养基:重量比,高粱98%,碳酸钙2%。制备方法为:高粱加水煮沸,煮至“无白心,不开花”的标准后,晾去水分,加入碳酸钙拌匀,高压灭菌126℃,90min。

[0058] 栽培料:重量比,棉籽壳58%、阔叶木屑30%、麦麸10%、石膏2%。含水量约为65%。

[0059] 实施例中用到的其他猴头菇市场种与野生种菌株信息及来源如表1:

[0060] 表1 菌株信息

	菌株编号	菌株来源	获得方式
[0061]	市场种	I044	购买
		MC-HE-1	
		MC-JN-1	
	野生种	猴 HE015	分离纯化得到, 经 ITS 鉴定, ITS 序列经 ncbi 序列比对, 与猴头菇 (<i>Hericium erinaceus</i>) ITS 相似性 100%
		M178	
		W461	
		E108	
		793	
		内蒙古阿尔山	
		山东, 鲁猴 1 号	
		广州市江南果蔬批发市场	

[0062] 实施例1 猴头菇新菌株猴HE015的分离与鉴定

[0063] 1、样本

[0064] 2017年08月, 本研究团队在内蒙古阿尔山进行大型真菌资源采集和调查时, 得到一份猴头菇样本(图1), 该猴头菇丛生于向阳的枯木上。

[0065] 2、分离过程

[0066] 通过组织分离, 从上述获得的猴头菇样本的子实体中分离纯化获得了一株纯菌株, 记录为猴HE015。

[0067] 具体方法为: 将野外采集获得的猴头菇子实体用75%酒精擦拭表面, 在无菌环境下撕开并夹取0.2-0.5 mm×0.2-0.5 mm的内部菌肉组织, 接入PDA培养基。置于25℃培养箱中恒温暗培养, 待菌丝长满斜面后取尖端菌丝转接纯化培养得到纯菌株。

[0068] 3、猴HE015的鉴定

[0069] (1) 形态鉴定

[0070] 对猴HE015菌菇的宏观形态及微观特征进行观察:

[0071] 子实体无柄或具非常短的侧生柄, 新鲜时肉质, 后期软革质, 无臭无味, 干燥后变为奶酪质或软木栓质, 略具馊味。

[0072] 菌盖近球形; 表面雪白色至乳白色, 后期浅乳黄色, 干后变为木材色, 具微绒毛, 干后粗糙, 无同心环纹。

[0073] 菌齿表面新鲜时雪白色或奶油色, 干后变为黄褐色, 强烈收缩; 圆柱形, 从基部向顶部渐尖, 新鲜时肉质, 干后硬纤维质, 长达10 mm, 每毫米1~2个。

[0074] 菌肉干后木材色, 奶酪质或软木栓质, 具穴孔, 无环区。

[0075] 菌柄白色至乳白色, 干后软木栓质。

[0076] 担孢子 5.8~7×4.8~5.9 μm, 椭圆形, 无色, 厚壁, 表面具细小疣突, 淀粉质, 嗜蓝。

[0077] (2) 分子鉴定

[0078] 将纯化后的猴HE015菌丝转接至表面盖有塞洛芬薄膜的平板培养基(加富综合PDA培养基), 置于25℃恒温避光培养。

[0079] 待菌丝长满平板后, 收集新鲜菌丝常温研磨, 利用全自动核酸提取仪配套使用磁

珠法基因组DNA提取试剂盒(广州迈宝生物科技有限公司,货号DNF628-05B)进行DNA基因组的提取,得到的DNA溶液(DNA模板)冷藏于-20℃备用。

[0080] 以上述所得DNA模板,通过真菌核糖体基因间隔区通用引物ITS1/ITS4(ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG, ITS4: TCCTCCGCTTATTGAT ATGC,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成)进行ITS-PCR检测。

[0081] PCR反应体系组成(共30μl)如下表2所示。

[0082] PCR反应扩增程序如表3所示。

[0083] PCR相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

[0084] 表2真菌ITS PCR体系

组成成分	用量 (μL)
2×Taq Master Mix	15
DNA 模板	2
PCR primer 1 (10μmol/L)	1.5
PCR primer 2 (10μmol/L)	1.5
ddH ₂ O	10

[0086] 表3真菌ITS PCR扩增程序

温度	时间
94℃	5min
94℃	30s
55℃	30s
72℃	30s
34×	
72℃	5min
25℃	1min

[0088] PCR产物直接送华大基因进行双向测序,测序结果如SEQ ID NO.10所示。

[0089] 猴HE015的ITS序列(SEQ ID NO.10):

[0090] GAAGGATCATTAATGAATTTGAAAGGAGTTGTTGCTGGCCTGAAACCCAGGCATGTGCACGCTCCAATCTCATCCATCTTACACCTGTGCACCCTTGCGTGGGTCCGTCGGCTTTGCGGTCGATGGGCTTGCGTTTTTCATAAACTCTTATGTATGTAACAGAATGTCATAATGCTATAAACGCATCTTATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATCCGAGGGGCACGCCTGTTGAGTGTGCTGA AATTCTCAACTCAATCCTCTTGTTATGAGAGGGCTGGGCTTGGAAGTGGAGGTCTTGCCGGTGCTCCCTCGGGAAGTCGGCTCCTCTTGAATGCATGA

GTGGATCTCTTTTGTAGGGTTTGGCCTTGGTGTGATAATTATCTACGCCGCGGGTAGCCTTGCGTTGGTCTGCTTCT
AACCGTCTTCGGACAACCTTTCATCTCAACTTGACCTCGAATCAGGCGGGACTACCCGCTGAACTTAAGC

[0091] 将测序结果在NCBI GenBank进行序列比对,发现与猴头菇 (*Hericium erinaceus*) 相似性高达100%。

[0092] 综合以上宏观及微观特征,结合ITS序列鉴定结果,确定猴HE015为猴头菇 (*Hericium erinaceus*),并于2022年05月12日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC No:62464,保藏地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0093] 实施例2猴HE015培养及品质对比

[0094] 本研究栽培对比了两个常见市场种(I044、MC-HE-1)及四个野生种(猴HE015、M178、W461、E108)的猴头菇菌株。

[0095] 一、实验方法:

[0096] 1、培养基配置

[0097] (1)母种培养基(PDA培养基):马铃薯去皮称取200g,切成小块放入锅中,加水1000mL,在电磁炉上加热煮沸,维持20-30min,用2层纱布过滤,弃渣,滤液补充至1000mL,滤液中加入葡萄糖20g、琼脂20g,小火加热,并用玻璃棒不断搅拌,防止琼脂糊底或溢出,待琼脂完全溶解后,再补充水分至所需。分装灭菌:固体培养基约为试管高度的1/5,分装时可用三角漏斗以免使培养基沾在管口或瓶口上造成污染。分装后加塞,7个试管一包扎,121℃灭菌20min,待温度降至80℃左右时,取出摆试管斜面。

[0098] (2)原种培养基:重量比,高粱98%,碳酸钙2%。在制种前一天下午,称量配方各成分,清水漂洗高粱2-3次,用清水浸泡过夜。浸泡后,用清水冲洗高粱,捞出高粱加水煮沸,同时不断搅拌,防止高粱糊底,当高粱煮至“无白心,不开花”的标准后,停止加热,将高粱倒入筛网,用清水冲洗,去掉粘稠物质,将高粱摊开,晾去表面水分,加入碳酸钙,手动搅拌均匀,装袋。高压灭菌126℃,90min,自然冷却,将培养基放置在接种室准备接种。

[0099] (3)栽培料:重量比,棉籽壳58%、阔叶木屑30%、麦麸10%、石膏2%。按配方称量原料,以1:(1.4-1.5)的料水比加水,闷2小时,充分吸水,最后调至含水量约为65%。

[0100] 2、平板接种法(测定菌丝生长速度)

[0101] 取经高温灭菌后的PDA培养基,将约15 mL培养基倒入无菌平板,待培养基凝固,同时温度降至室温时,在平板中心接种2mm×2mm母种菌块,于25℃恒温培养。每个菌种设置6个重复,培养7-8 d,每天观察记录菌丝长势、色泽、生长速度。

[0102] 3、栽培袋法

[0103] 采用15×56×0.05厘米的聚丙烯塑料袋,每袋装2kg栽培料,适度压紧栽培料,然后扎紧栽培袋口。高压灭菌126℃,90min,自然降温,打开灭菌锅锅盖,取出放置在接种室。原种菌块接种后置25℃培养室避光培养,每周观察菌丝生长情况,记录菌丝长势、色泽生长速度及是否污染杂菌。每个品种制备20包。

[0104] 4、子实体产量比较

[0105] 待菌丝长满菌袋、出现原基时,即可移入出菇室,置于菇架上,立于地上,温度控制在16℃~20℃,不要低于12℃或高于23℃,空气湿度控制在90%左右,可采用地面洒水、空间喷雾的方式,勿将水直接喷在子实体上。子实体生长阶段,保证有散射光,以200 lx~400 lx为宜,并且有良好的通风环境。出菇后,分别详细记录各品种菇体形态、平均产量等指

标。

[0106] 5、子实体活性成分分析

[0107] 采收后的各品种猴头菇子实体,经烘干粉碎后,参照农业农村部标准《NY/T1676-2008食用菌中粗多糖含量的测定》测定猴头菇中多糖含量。

[0108] 二、实验结果:

[0109] 1、菌丝生长情况

[0110] 由实验结果(表4)可知,猴HE015母种菌丝平均生长速度最快,且长势与市场种MC-HE-1相当。M178长势最为稀疏,生长速度较慢。

[0111] 由表5可知,6个猴头菇品种原种接种栽培,经21-30d发菌可长满菌丝,发菌速度、菌丝色泽无较大差异,其中猴HE015发菌速度最快,仅需21d即长满菌丝;各品种菌丝长势均较好,其中猴HE015、MC-HE-1相对更好;除W461和MC-HE-1出现菌包污染杂菌情况,其余各品种均未出现杂菌污染。

[0112] 表4各猴头菇品种母种菌丝长势和生长速度

[0113]

品种	菌丝长势	菌丝色泽	平均生长速度 (mm/d)	污染情况
I044	+++	洁白	6.5	无
猴 HE015	++++	洁白	7.3	无
M178	++	洁白	6.2	无
W461	+++	乳白	6.7	无
E108	+++	洁白	6.8	无
MC-HE-1	++++	洁白	7.1	无

[0114] 注:菌丝长势考察菌丝洁白、浓密程度,+,++,+++,++++表示菌丝长势逐渐增强。

[0115] 表5各猴头菇品种栽培阶段菌丝长势和生长速度

[0116]

品种	长满天数/d	菌丝长势	菌丝色泽	污染情况
I044	30	+++	乳白	无
猴 HE015	21	++++	洁白	无
M178	23	+++	洁白	无
W461	25	+++	乳白	2包
E108	23	+++	洁白	无
MC-HE-1	22	++++	洁白	1包

[0117] 注:菌丝长势考察菌丝洁白、浓密程度,+,++,+++,++++表示菌丝长势逐渐增强。

[0118] 2、子实体生长情况

[0119] 由表6可知,不同品种菌株子实体外观生物学性状、产量存在较大差异。6个猴头菇品种头茬采收天数在14-18天之间,菇体横径在7.8-10.6cm之间,纵径在6.5-8.2cm之前,单包平均产量在0.525-0.706kg。

[0120] 其中,头茬菇采收时间最短,单个菇体(横径、纵径)最大,平均产量最高的是猴HE015,平均产量比MC-HE-1高出近10%(8.6%)。

[0121] M178品种头茬菇采收时间最长,单个菇体(横径、外径)属于偏下水平,平均产量最低。

[0122] 表6 不同品种猴头菇生物学性状和产量

[0123]	品种	头茬菇采收天数/d	菌刺长度/cm	横径/cm	纵径/cm	平均产量(kg/包)
	I044	15	长	8.4	6.9	0.554±0.068
	猴 HE015	14	中等	10.6	8.2	0.706±0.095
	M178	18	长	7.9	6.5	0.525±0.070
	W461	14	短	8.5	7.1	0.612±0.055
	E108	16	中等	7.8	7.3	0.594±0.072
	MC-HE-1	15	短	9.0	7.8	0.650±0.081

[0124] 3、子实体活性成分分析

[0125] 见表7,6个猴头菇品种子实体中,多糖含量由高到低依次为M178>MC-HE-1>W461>猴HE015>E108>I044。

[0126] 表7 各品种猴头菇子实体多糖含量测定结果

[0127]	品种	多糖含量/%
	I044	4.85±0.21
	猴 HE015	5.21±0.36
	M178	5.68±0.29
	W461	5.27±0.35
	E108	5.13±0.22
	MC-HE-1	5.38±0.21

[0128] 综上实验,采用了平板接种法,通过测定待选菌株菌丝生长速度及长势初步评估不同生产菌株的优劣;随后通过袋栽法,制备菌包并接种菌种,通过观测菌种发菌速度、菌丝长势、子实体产量及子实体主要有效成分测定,进一步评估待选菌种质量与生产性能,优选猴头菇最优生产菌种(菌丝密壮、发菌快、产量高、子实体目标有效成分含量高)。研究结果显示,收集的6个菌种菌丝平均生长速度为6.3-7.2 mm/d,菌包菌丝长满时间为21-30 d,头茬菇采收时间为14-18天,平均产量为0.525-0.706 kg,子实体多糖含量为4.85%-5.68%,不同菌种质量与生产性能存在较大差距。我们在菌种选择过程中,依据目前采集得到数据,重点选择菌丝密壮、发菌快、抗杂菌污染能力强、子实体产量高,多糖有效成分含量高的菌种。综合分析菌种猴HE015具有母种菌丝密壮、原种发菌快、抗杂菌污染能力强、头茬菇采收

时间短、子实体产量高等优势,虽然多糖含量略低于其他菌种,但综合比较猴HE015菌种为最优生产菌种。

[0129] 猴HE015子实体表型如图2所示。

[0130] 实施例3猴HE015基因组测序与特异分子标记开发

[0131] 本发明利用三代(Nanopore)+二代的测序策略,获得了猴HE015基因组序列信息,基因组大小为39.45 Mb,N50为2.79 Mb,其中17.23%的序列为重复序列,注释获得11756个功能基因,367个tRNA及25个rRNA。此外,采用全基因组重测序技术获得广泛收集的市场栽培菌株及野外采集的野生种的基因组序列信息,将获得的数据比对到猴HE015基因组上,获得InDel变异位点集,有针对性地设计特异性引物,通过PCR扩增获得了野生猴头菇菌株猴HE015的特异DNA片段,即为猴头菇菌株猴HE015的分子标记。具体实验如下:

[0132] 1、基因组测序与组装

[0133] 收集猴头菇猴HE015菌株成熟子实体的菌刺,使用无菌水洗脱菌刺上的孢子,筛选担孢子萌发的单核菌丝进行高质量DNA提取。并基于Illumina二代测序平台和Nanopore三代平台进行测序。对于二代测序文库,插入大小为350bp,双端测序长度为150bp。通过酶切法片段化300 ng基因组DNA。片段化的DNA通过磁珠筛选到平均大小为200-400 bp。所选片段经过末端修复、3'腺苷酸化、接头连接,PCR产物通过磁珠纯化。对于三代测序文库,将基因组DNA经26 Gneedle片段化,使用BluePippin选择20 kb以上的片段,经末端修复和加A尾,在片段两端分别连接接头,制备DNA文库。构建好的文库经Qubit浓度定量,文库质检合格后,根据文库的有效浓度及数据产出需求使用Nanopore平台进行测序。

[0134] 利用Nextdenovo及Necat 2个软件对三代测序数据进行组装,大致可以分为三部分:①使用Nextdenovo及Necat分别对Nanopore数据进行组装,Nextdenovo使用以下参数:read_cuffoff=3k, seed-cutoff=9k;Necat使用以下参数:GENOME_SIZE=45000000,MIN_READ_LENGTH=2000, PREP_OUTPUT_COVERAGE=40, NUM_ITER=3, 其余默认参数。②用Medaka对输出结果进行polish,默认参数;③二代数据对组装结果校正:pilon 默认参数。对不同软件的组装结果进行统计,对组装序列比对同源序列进行评估,选择组装效果最好的组装序列作为猴HE015的基因组序列。

[0135] 2、全基因组重测序与InDel变异位点集获得筛选

[0136] 将广泛收集的猴头菇市场种与野生种猴头菇菌株(猴HE015、W461、I044、793、E108、MC-JN-1、MC-HE-1、M178)接种于平板培养基(加富综合PDA培养基)上,收集菌丝体并提取总DNA,基因组DNA检测合格后,用酶切法将DNA片段化,然后对片段化的DNA进行纯化、末端修复、3'端加A、连接测序接头,再用磁珠进行片段大小选择,进行PCR扩增形成测序文库,建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用Illumina进行双端测序,测序序列读长150bp,产生5G以上的数据。

[0137] 对测序得到的原始测序序列(Raw Reads)进行过滤,得到Clean Reads,用于后续信息分析。数据过滤的主要步骤如下:(1) 去除带接头(adapter)的reads;(2) 过滤N含量超过10%的reads;(3) 去除质量值低于10的碱基超过50%的reads。使用BWA软件将得到的clean reads定位猴头菇猴HE015基因组上,使用GATK的HaplotypeCaller(局部单体型组装)算法进行InDel变异检测,得到最终的变异位点集。从中选择变异位点的覆盖度与基因型质量值高的位点进行引物设计。

[0138] 3、特异性引物设计与PCR扩增

[0139] 从Indel变异位点集中选择变异位点的覆盖度与基因型质量值高的位点进行引物设计。我们设计筛选得到三组引物对(HE015-F2/R2、HE015-F4/R4、HE015-F8/R8),引物信息如下:

[0140] HE015-F2(SEQ ID NO.4): GCAGTGGTCTCAAAGGCCAT,

[0141] HE015-R2(SEQ ID NO.5): GAAACTTGGTGCTGCAGAGC;

[0142] HE015-F4(SEQ ID NO.6): CGGGGTCTGGGATGAGACC,

[0143] HE015-R4(SEQ ID NO.7): GAATGGGCAAATGAGGTCTGGG;

[0144] HE015-F8(SEQ ID NO.8): CCTGCAAGCCATCGGACGTA,

[0145] HE015-R8(SEQ ID NO.9): CTTGGTCTACGCTACGTCC。

[0146] 引物对由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR扩增在BioRad PCR仪上进行,PCR反应液组成(共30 μ l)如表8所示。

[0147] 表8 猴HE015分子标记PCR体系

	组成成分	用量 (μ L)
	2x Taq Master Mix	15
[0148]	DNA 模板 (50 ng/ μ L)	2
	正向引物 (10 μ mol/L)	1
	反向引物 (10 μ mol/L)	1
	ddH ₂ O	11

[0149] PCR程序为:95 $^{\circ}$ C预变性,95 $^{\circ}$ C变性15 sec,58 $^{\circ}$ C退火15sec,72 $^{\circ}$ C延伸15sec, G0T0step2,执行32个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

[0150] 将PCR产物置于1-1.5%琼脂糖凝胶上电泳(5v/cm) 25 min,置于凝胶成像系统中拍照。

[0151] 4、PCR扩增结果与分析

[0152] (1) 引物对HE015-F8/R8扩增结果如图3所示:

[0153] 如图3,HE015-F8/R8引物在猴HE015中扩增出单一的扩增条带,大小在400-500bp之间,其他市场菌株或野生菌株均没有条带(图3)。

[0154] 将HE015-F8/R8扩增获得的PCR产物送华大基因进行双向测序,获得具体序列信息如下SEQ ID NO.1所示,大小为457bp,该特异DNA片段是本发明猴头菇新菌株猴HE015的Indel分子标记。

[0155] SEQ ID NO.1序列(HE015-F8/R8扩增产物序列):

[0156] CCTGCAAGCCATCGGACGTATTGAGAAGTCCAAAATGAAGACGAAGAAAGAAATCAGTAGATTGACAAG
CAAGTGTCATAAGAGTTGGTCTCGTTGAAGGAGAGCCGGACTTGTGCGGATATCGCAGAGCAATGGAAGCGAAAAG
ACGCGCATCGAGGGAGACGACGAAGGGACGAAAAAAGAAGGAGGGAAGGGGGGATGAAGATGAAGAAATTGAGAA
AACAGCATCGGTGGCCGCAATAATCCCGTCGGCGTAGACACGGAAGCGAACAGGAAGCGAGCGCAGCGGTGTCTGA
AGATACAGACAGTAATAGCAAAAATGAACGCAGCAATGTTCCGGTCGGAAGAAATGGCAATATGGGGGCAACGAATGG

AAGGACAACCTCACAATGAAACGCACTGATGCCAATTAATTTGCAGATTGAGATCATTCGTAGGACGTAGCGTAGACC
AAG

[0157] (2) 引物对HE015-F2/R2和HE015-F4/R4扩增结果如图4所示:

[0158] 图4中A图所示, HE015-F4/R4在猴头菇MC-JN-1中扩增条带与猴HE015大小相近(HE015-F4/R4扩增猴HE015的产物经测序, 序列信息如SEQ ID NO.2所示), 其余6株对照菌株则无条带或者条带大小不同, 因此, 该引物可将猴HE015与MC-JN-1之外的6株猴头菇菌株区分开来。

[0159] 如图4中B图所示, HE015-F2/R2在猴头菇M178中扩增的条带与猴HE015大小相近(HE015-F2/R2扩增猴HE015的产物经测序, 序列信息如SEQ ID NO.3所示), 其余对照菌株则无有效扩增或者条带大小不同, 因此, 该引物可将猴HE015与M178之外的6株猴头菇菌株区分开来。

[0160] 综合使用HE015-F2/R2与HE015-F4/R4可将猴HE015与其他菌株有效区分。

[0161] SEQ ID NO.2序列(HE015-F4/R4扩增产物序列):

[0162] CATAGGCCTGTGTCCACCCGGGCGAGCCGCCGGGTTTTCGGGGTGTAAGATCATAGCTCGCTCCCGGC
GGGGCCGGTTTTTCGGGGTTCAGGGTGTGCAACCTTTACCGGGATTATCAGGGTCTCTGTTACACTCGCGTTACAGT
TATTTATTTATTTAACGTTAGGCGCTCAGGACCCGACAGTGTTCTGGGAGTTTACCGGTTTTGAACATATATATGTAC
CTCCCTCAATACGCTAAACAACCTGTCTTCTGTGTGAGGTCAGCAACGGAGATCAGATACCTCCCAGCTAAATATTCTG
AACTGTTCAATTTCTCGGGCAGATTTATCTAACCGGTTATATGCTATGGACGAGCAGATAAGCGTCTACTTAATCCT
TCTGGCCCTTGACGTCCAACAGCCATTTCCCGACCTCATTTGCCCATTC

[0163] SEQ ID NO.3序列(HE015-F2/R2扩增产物序列):

[0164] GCAGTGGTCTCAAAGGCCATCCCAGGCAGCTATGACGAGGTTTCAGGTGAAATATCGCAGCCAAGGCACC
TCTTGCCCATTTGTATCTACAAAGCATACTGAAGGACGAGGCACACATTGCCTAGTGCCACAAGTAGAATCAATTTTA
AGACAGCTGCCCCAGCAGGTGGTATCAAACGTTTCAAGAATAGATCACAAATGAGGTGTTATCTTACAATCCCAACA
TGTCTGCATGCCTACATCTCATCAACAAGACCACTTTCCCGACCAGTGCCCTACAATCTATCCAATATCTCCTTCCA
TTCCTTACAAATTCTTGTTCACTTGGCAGCATTTTGACCTTCATTCGACAATACCTAGCTTTCCATGTGAATTGC
ACACTGCAAGCTCTCTCAACTTCTTCTGATGGGCACCTTTGTTGCTCTGCAGCACC

[0165] 综上所述结果:

[0166] (1) 单独使用引物对HE015-F8/R8(对应分子标记SEQ ID NO.1)即可将猴HE015与其他猴头菇菌全部区分开。

[0167] (2) 同时使用HE015-F2/R2与HE015-F4/R4(对应分子标记SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.2)也可将猴HE015与其他猴头菇菌全部区分开;这两组引物同时均能扩出对应相同条带的为猴HE015。

[0168] 基于上述结果, 本发明提供了猴HE015的检测或鉴定产品, 用于猴HE015的品控提供技术依据。

[0169] 实施例4猴HE015提取物的制备

[0170] 1、猴HE015液体发酵培养物(HEF)的制备:

[0171] 猴HE015母种经逐级扩大培养后接种于灭菌后的液体PDA培养基, 置于25 °C, 150转/分钟的摇床中, 培养至培养基变成黄棕色、布满菌丝体, 停止培养, 离心获得菌丝体, 培养液采用旋转蒸发仪减压浓缩; 将菌丝体和发酵浓缩液混合匀浆, 冷冻干燥, 粉碎后得猴

HE015液体发酵培养物(HEF)。

[0172] 2、猴HE015子实体小分子提取物(HEFX)、猴HE015子实体多糖提取物(HEFP)的制备:

[0173] 猴HE015子实体粉碎后,加入20倍量纯化水,95℃搅拌提取2h;过滤,滤液减压浓缩至相对密度至1.10,缓慢加入95%乙醇使醇浓度至80%,4℃静置24h;上清液减压浓缩,冷冻干燥,粉碎后得猴HE015子实体小分子提取物(HEFX);下层沉淀用5倍水复溶,加95%乙醇调整醇浓度为80%,4℃静置24h;下层沉淀经80%乙醇、丙酮清洗后,冷冻干燥,粉碎后即得猴HE015子实体多糖提取物(HEFP)。

[0174] 3、猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物(HESX)、猴HE015固体培养菌丝体多糖提取物(HESP)的制备:

[0175] 猴HE015母种经逐级扩大培养后接种于灭菌后的固体PDA培养基,置于25℃培养室,直至长满菌丝体;取出培养物,选取菌丝体生长密实部位,撕成小块后加入20倍量纯水,95℃搅拌提取2h;过滤,滤液减压浓缩至相对密度至1.10,缓慢加入95%乙醇使醇浓度至80%,4℃静置24h;上清液减压浓缩,冷冻干燥,粉碎后得猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物(HESX);下层沉淀用5倍水复溶,加95%乙醇调整醇浓度为80%,4℃静置24h;下层沉淀经80%乙醇、丙酮清洗后,冷冻干燥,粉碎后即得猴HE015固体培养菌丝体多糖提取物(HESP)。

[0176] 实施例5猴HE015提取物对酒精性胃粘膜损伤具有改善作用

[0177] 1、实验动物

[0178] 雄性KM小鼠,SPF级,体重18-22g,5-6周龄,饲养温度与湿度:23±1℃,55±10%,采用12h昼夜间断照明;饲养室条件始终保持稳定,以保证试验结果的可靠性。小鼠自由进食饮水。

[0179] 2、实验分组

[0180] 雄性KM小鼠经适应性饲养7d后,随机分成如下8组:

[0181] 空白对照组1:正常组(Control)、

[0182] 模型对照组1:模型组(Model)、

[0183] 给药组1:阳性药组(Positive)、

[0184] 给药组2:猴HE015液体发酵培养物组(HEF)、

[0185] 给药组3:猴HE015子实体多糖提取物组(HEFP)、

[0186] 给药组4:猴HE015子实体小分子提取物组(HEFX)、

[0187] 给药组5:猴HE015固体培养菌丝体多糖提取物组(HESP)、

[0188] 给药组6:猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物组(HESX),

[0189] 模型组小鼠14只,其余各组小鼠13只,给予普通饲料喂养。

[0190] 3、实验过程

[0191] 实验为期2周:

[0192] 第1周:各给药组小鼠预防性给药,每日灌胃1次,给药浓度见表9,同时正常组和模型组小鼠给予纯水灌胃0.3mL;

[0193] 第2周:模型组和各给药组小鼠开始给予60%乙醇灌胃0.3mL造模,每日1次,诱发小鼠慢性酒精性胃粘膜损伤模型,造模1周;同时给药组继续给予药物治疗(给药浓度及给药量同第1周),观察不同给药组对胃粘膜的保护作用。

[0194] 表9 各组给药浓度和给药量

	组名	给药浓度	给药体积
	正常组 (Control)	纯水	0.3mL
	模型组 (Model)	60%乙醇	0.3mL
	阳性药组兰索拉唑 (Positive)	0.35mg/mL	0.3mL
[0195]	猴 HE015 液体发酵培养物组 (HEF)	10mg/mL	0.3mL
	猴 HE015 子实体多糖提取物组 (HEFP)	10mg/mL	0.3mL
	猴 HE015 子实体小分子提取物组 (HEFX)	10mg/mL	0.3mL
	猴 HE015 固体培养菌丝体多糖提取物组 (HESP)	10mg/mL	0.3mL
	猴 HE015 固体培养菌丝体小分子提取物组 (HESX)	10mg/mL	0.3mL

[0196] 实验结束前晚,停止给药,禁食不禁水。摘眼球取血,随后颈椎脱臼法处死小鼠,取胃组织置于4%多聚甲醛固定液中固定,用于病理检测。

[0197] 4、实验结果

[0198] (1)猴头菇猴HE015提取物对慢性酒精性胃粘膜损伤小鼠体重的影响

[0199] 如图5中A图:预防性给药期间:各组小鼠体重比较均无显著性差异($P>0.05$),呈增加趋势。造模期间,正常组小鼠体重继续呈增加趋势,其余各组小鼠体重呈下降趋势,模型组、给药组和阳性药组小鼠体重显著低于正常组($P<0.01$),说明造模对体重影响很大。

[0200] 实验结束,各给药组小鼠体重均高于模型组,其中给药组HESX、HEFX、HEFP组和阳性药组小鼠体重显著高于模型组($P<0.05$);给药组HESX、HEFP组小鼠体重高于阳性药组,但差异不显著($P>0.05$)。结果表明,猴HE015提取物可以减少对慢性酒精性胃粘膜损伤小鼠体重的影响,尤其是猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物(HESX)、猴HE015子实体多糖提取物(HEFP)、猴HE015子实体小分子提取物(HEFX)效果显著,甚至优于阳性药。

[0201] (2)猴头菇猴HE015提取物对慢性酒精性胃粘膜损伤小鼠生存曲线的影响

[0202] 如图5中的B图,与正常组相比,其余各组小鼠生存率均呈下降趋势,说明造模对生存率有明显影响。

[0203] 实验结束,模型组、阳性药组和给药组HESP组小鼠死亡数量明显高于其他组,阳性药组和给药组HESP组仅略高于模型组;而HEF、HEFP、HEFX、HESX组小鼠生存率显著高于模型组,说明猴HE015液体发酵培养物(HEF)、猴HE015子实体多糖提取物(HEFP)、猴HE015子实体小分子提取物(HEFX)、猴HE015固体培养菌丝体小分子提取物(HESX)药效较好,可以延长个体存活时间。

[0204] (3)小鼠胃组织HE染色结果

[0205] 小鼠胃组织HE染色结果见图6,正常组小鼠胃组织胃粘膜结构完整清晰,细胞形态完整,腺体排列规则,未见组织缺损、出血、炎症等异常病变。模型组小鼠胃组织粘膜层细胞弥散性坏死脱落情况严重,细胞肿大、排列松散,有炎细胞浸润。阳性药组小鼠胃组织部分粘膜上皮细胞坏死脱落,部分细胞排列松散,有少量炎细胞浸润。与模型组相比,猴HE015提取物给药组小鼠胃组织胃粘膜形态有不同程度改善,且优于阳性药。

[0206] 综上结果:猴HE015提取物HESX、HEFX、HEFP组和阳性药兰索拉唑均可以增加酒精慢性胃粘膜损伤小鼠的体重,减少酒精慢性胃粘膜损伤对小鼠体重的影响;提取物HEF、HEFP、HEFX、HESX可以延长个体存活时间;提取物HEF、HEFP、HEFX、HESP和HESX可以改善酒精慢性胃粘膜损伤小鼠胃粘膜。结果表明:本发明的猴HE015提取物可以用于改善酒精慢性胃粘膜损伤,以子实体提取物更优。

[0207] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。



图1

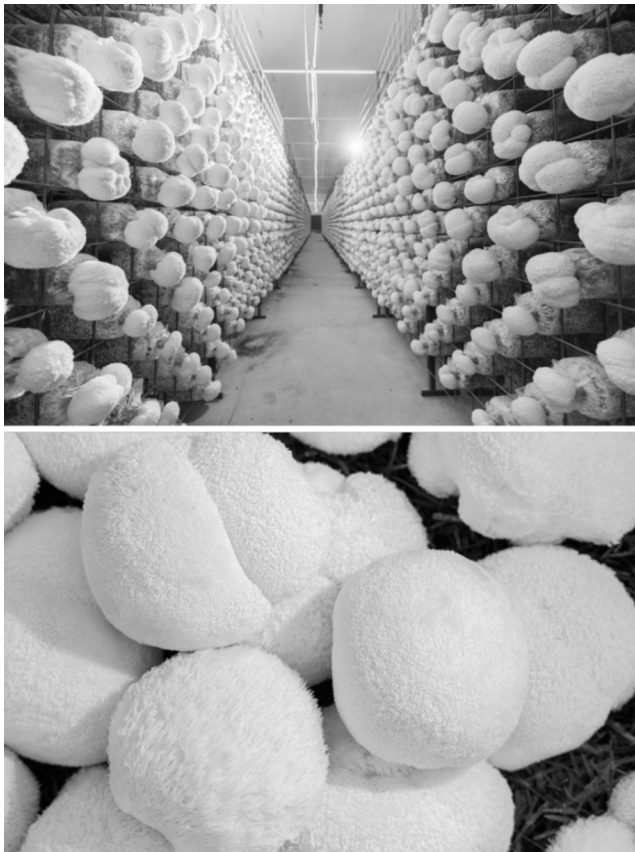


图2

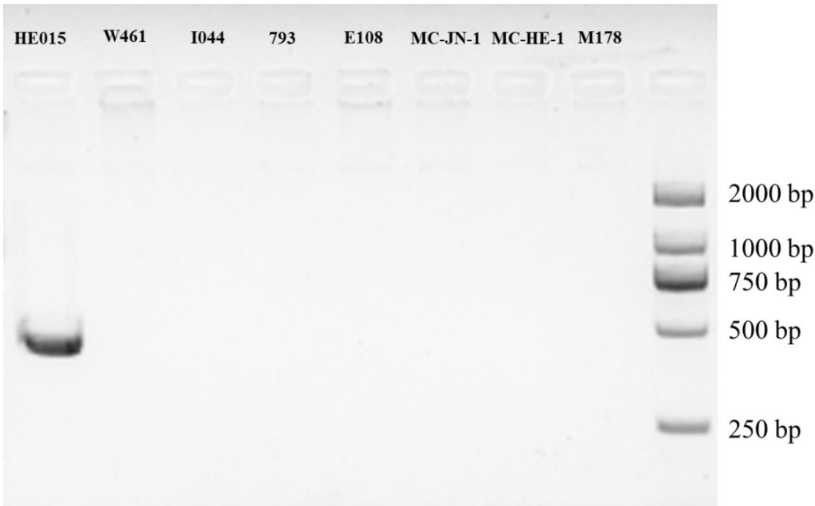


图3

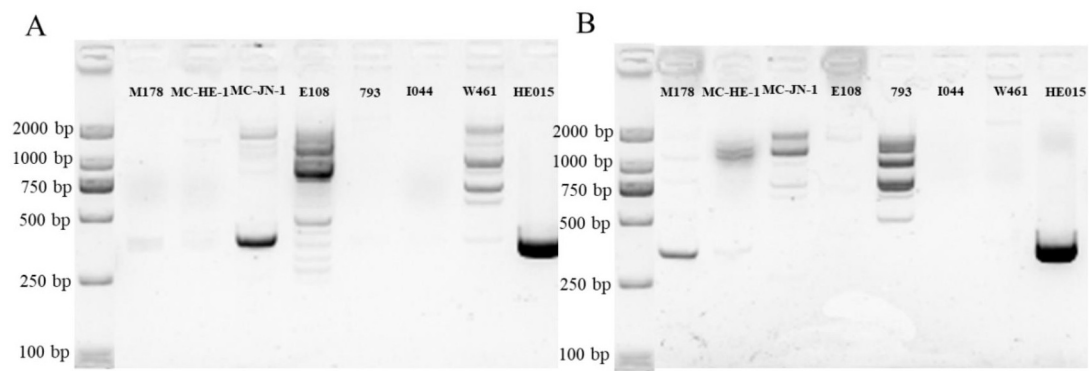


图4

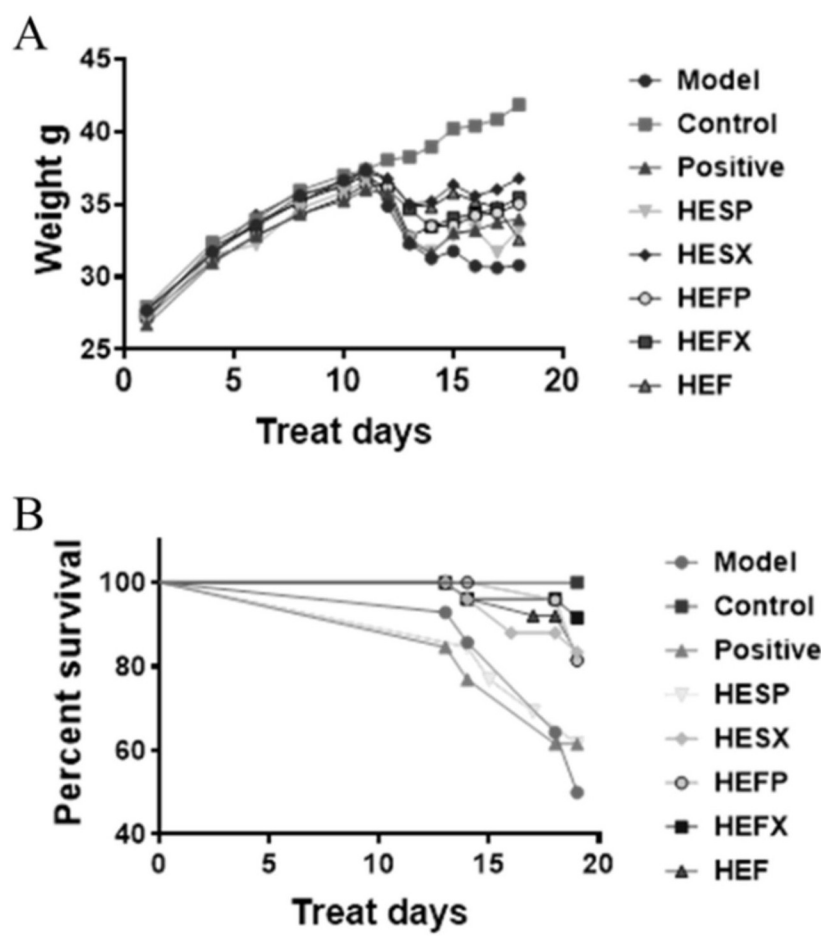


图5

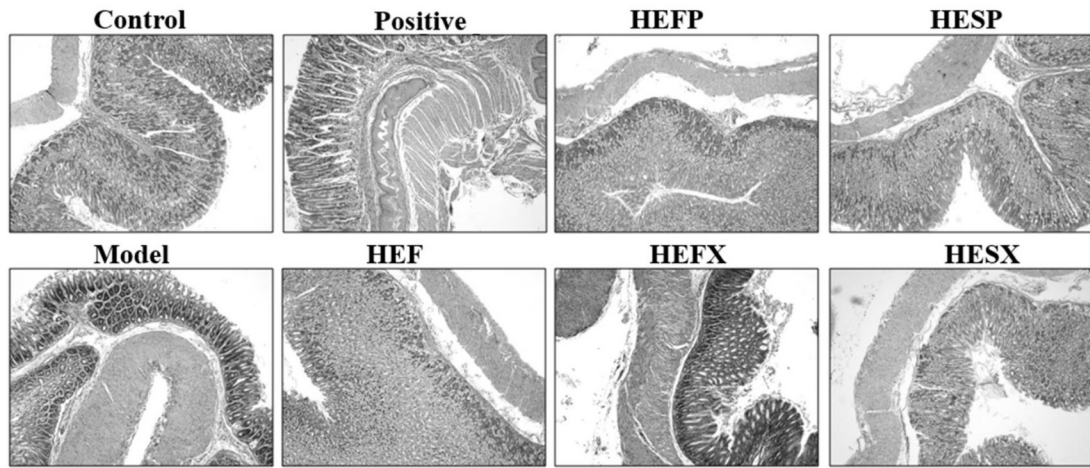


图6