



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 121079394 A

(43) 申请公布日 2025. 12. 05

(21) 申请号 202480017586.4

(22) 申请日 2024.04.26

(66) 本国优先权数据

202410361686.0 2024.03.28 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2024/090037 2024.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02025/200075 ZH 2025.10.02

(83) 生物保藏信息

GDMCC No.:62464 2022.05.12

(71) 申请人 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

申请人 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 (2006.01)

A23L 33/125 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

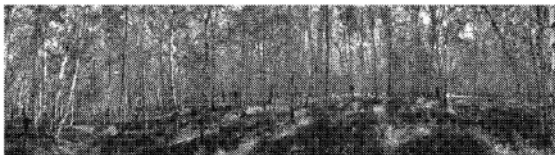
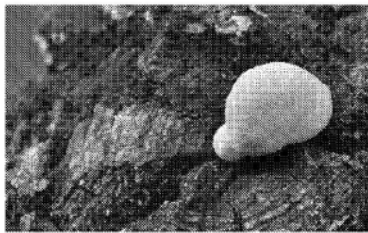
C12R 1/645 (2006.01)

(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

提供了一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和应用。通过广泛采集野生菌,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GDMCCNo.:62464。新菌株猴HE015遗传背景与现有猴头菇菌种不同,补充了优质猴头菇栽培品种,满足市场需求。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,同时多糖等活性成分含量也较高,其提取物可以保护胃粘膜、改善酒精性胃粘膜损伤,效果尤以子实体提取物效果更为显著,具有产业化前景。



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 10 月 2 日 (02.10.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/200075 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/14 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
A23L 2/39 (2006.01) *C12Q 1/6895* (2018.01)
A23L 31/00 (2016.01) *C12N 15/11* (2006.01)
A23L 33/125 (2016.01) *C12R 1/645* (2006.01)

省微生物分析检测中心) (INSTITUTE OF MICRO-BIOLOGY, GUANGDONG ACADEMY OF SCIENCES(GUANGDONG DETECTION CENTER OF MICROBIOLOGY)) [CN/CN]; 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/090037

(22) 国际申请日: 2024 年 4 月 26 日 (26.04.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202410361686.0 2024年3月28日 (28.03.2024) CN

(71) 申请人: 无限极(中国)有限公司 (INFINITUS (CHINA) COMPANY LTD.) [CN/CN]; 中国广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号 529156 (CN)。广东省科学院微生物研究所(广东

(72) 发明人: 周勇(ZHOU, Yong); 中国广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号 529156 (CN)。吴清平(WU, Qingping); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。蔡曼君(CAI, Manjun); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。寇秀颖(KOU, Xiuying); 中国广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号 529156 (CN)。刘远超(LIU, Yuanchao); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。吴晓贤(WU, Xiaoxian); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070

(54) Title: NEW HERICIUM ERINACEUS HE015 STRAIN OF HERICIUM ERINACEUS, AND MOLECULAR MARKER AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和应用

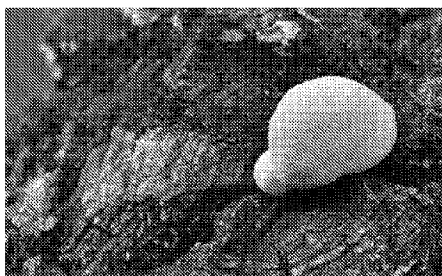


图 1

(57) Abstract: Provided are a new Hericium erinaceus HE015 strain of Hericium erinaceus, and a molecular marker and the use thereof. By means of extensive wild strain collection and systematic breeding, a high-quality new Hericium erinaceus HE015 strain of Hericium erinaceus is obtained. The strain is deposited in the Guangdong Microbial Culture Collection Center on 12 May 2022, with the deposit number of GDMCC No: 62464. The new Hericium erinaceus HE015 strain has a different genetic background from existing Hericium erinaceus strains, and therefore a high-quality Hericium erinaceus cultivar is supplemented, meeting market demands. Further provided are a specific molecular marker and a rapid detection method for detecting and identifying Hericium erinaceus HE015. The mother culture of Hericium erinaceus HE015 has dense and strong mycelium, fast mycelial growth rate, and strong resistance to contamination by foreign bacteria. The strain has advantages such as high yield and a short growth cycle, and also has a relatively high content of active ingredients such as polysaccharides. Extracts of the strain can protect gastric mucosa and ameliorate alcoholic gastric mucosal damage, with the fruiting body extract thereof showing especially significant effects. Therefore, the strain has industrialization prospects.



WO 2025/200075 A1



(CN)。胡惠萍(HU, Huiping); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。卓丽君(ZHUO, Lijun); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。唐健(TANG, Jian); 中国广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号 529156 (CN)。陶倩(TAO, Qian); 中国广东省江门市新会区会城镇七堡工贸城北区三号 529156 (CN)。谢意珍(XIE, Yizhen); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。张智(ZHANG, Zhi); 中国广东省广州市越秀区先烈中路100号大院 510070 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司(YOGO PATENT AND TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦B塔4416室 510620 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。

(57) 摘要: 提供了一种猴头菇新菌株猴HE015及其分子标记和应用。通过广泛采集野生菌, 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GDMCCNo: 62464。新菌株猴HE015遗传背景与现有猴头菇菌种不同, 补充了优质猴头菇栽培品种, 满足市场需求。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, 同时多糖等活性成分含量也较高, 其提取物可以保护胃粘膜、改善酒精性胃粘膜损伤, 效果尤以子实体提取物效果更为显著, 具有产业化前景。

一种猴头菇新菌株猴 HE015 及其分子标记和应用

技术领域

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

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。已成为开发功能性食品、保健品和药品的重要原料。

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。

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

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。

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。

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。

本发明再一目的是提供所述猴 HE015 的提取物及其应用。

本发明上述目的通过以下技术方案实现：

5 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。

10 因此，本发明提供如下应用方案：

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。

一种含有上所述新菌株猴 HE015 的猴头菇菌剂。

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。

15 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。

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。

20 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。

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。

25 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。

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。

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，

30 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；

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。

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。

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。

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

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。

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。

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, GOTO step2, 执行 32 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

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。

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。

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。

具体来说,作为可选方案,提取物的提取方法如下:

(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;

(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;

(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。

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。

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。

最后，本发明的猴 HE015、以及含有猴 HE015 的菌剂、猴 HE015 的提取物(尤其是子实体提取物)在制备具有保护胃黏膜作用或具有治疗或改善酒精性胃
5 粘膜损伤作用的产品中的应用，也应在本发明保护范围之内。

以及含有所述猴头菇多糖提取物和/或所述猴头菇小分子提取物的保护胃黏膜或改善酒精性胃粘膜损伤的产品，也应在本发明保护范围之内。

作为产业化应用之一，具体地，猴 HE015 菌株栽培的子实体提取物可以应用在功能食品中，例如与高良姜、陈皮、无花果、代代花、低聚果糖或低聚木糖
10 等原料复配制备成具有保护胃粘膜以及改善肠道菌群功能的产品，剂型可以是固体饮料、液体条包等。

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。

本发明具有以下有益效果：

15 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。

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
20 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。

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
25 的鉴别及相关产业的质量控制提供技术依据。

附图说明

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）。

图 2 为猴 HE015 驯化后子实体表型。

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

30 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。

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。

5 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

以下结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本领域常规试剂、方法和设备。除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

10 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 B₁ 0.001%,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、
15 维生素 B₁ 0.01 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。

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。
20 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。

25 原种培养基:重量比,高粱 98%,碳酸钙 2%。制备法为: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。

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%。

30 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:

表 1 菌株信息

	菌株编号	菌株来源	获得方式
市场种	I044	黑龙江省加格达奇农林科学院	购买
	MC-HE-1	山东，鲁猴 1 号	
	MC-JN-1	广州市江南果蔬批发市场	
野生种	猴 HE015	内蒙古阿尔山	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	湖南莽山	
	W461	贵州梵净山	
	E108	内蒙古阿尔山	
	793	河南宝天曼	

实施例 1 猴头菇新菌株猴 HE015 的分离与鉴定

1、样本：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。

2、分离过程：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。

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 0.2-0.5mm×0.2-0.5mm 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。

3、猴 HE015 的鉴定

（1）形态鉴定：对猴 HE015 菌菇的宏观形态及微观特征进行观察：

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。

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。

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。

菌肉干后木材色，奶酪质或软木栓质，具穴孔，无环区。

菌柄白色至乳白色，干后软木栓质。

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

(2) 分子鉴定：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。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。

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。

PCR 反应体系组成（共 30μl）如表 2 所示。PCR 反应扩增程序如表 3 所示。
PCR 相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

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

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

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。
猴 HE015 的 ITS 序列（SEQ ID NO.10）：

GAAGGATCATTAATGAATTTGAAAGGAGTTGTTGCTGGCCTGAAACC
CAGGCATGTGCACGCTCCAATCTCATCCATCTTACACCTGTGCACCTTGC
GTGGGTCCGTCGGCTTTGCGGTCGATGGGCTTGCGTTTTTCATAAACTCTT
ATGTATGTAACAGAATGTCATAATGCTATAAACGCATCTTATACAACTTTC

AACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGACGCCTGTTTCGAGTGTCTGTGAA
ATTCTCAACTCAATCCTCTTGTTATGAGAGGGCTGGGCTTGGACTTGGAGG
5 TCTTGCCGGTGCTCCCTCGGGAAGTCGGCTCCTCTTGAATGCATGAGTGGA
TCTCTTTTGTAGGGTTTGCCCTTGGTGTGATAATTATCTACGCCGCGGGTA
GCCTTGCGTTGGTCTGCTTCTAACCGTCTTCGGACAACCTTTCATCTCAACTT
GACCTCGAATCAGGCGGGACTACCCGCTGAACTTAAGC

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

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。

15 实施例 2 猴 HE015 培养及品质对比

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。

一、实验方法：

1、培养基配置

20 (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
25 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。

(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，
30 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。

(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
35 至含水量约为 65%。

2、平板接种法(测定菌丝生长速度)：

取高温灭菌的 PDA 培养基，将约 15mL 培养基倒入无菌平板，待培养基凝固且温度降至室温时，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 7-8d，每天观察记录菌丝长势、色泽、生长速度。

3、栽培袋法：

5 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。原种菌块接种后置于 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。

10 4、子实体产量比较：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。

5、子实体活性成分分析

15 采收后的各品种猴头菇子实体，经烘干粉碎后，参照农业部标准《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。

二、实验结果：

1、菌丝生长情况

20 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。

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。

25 表 4 各猴头菇品种母种菌丝长势和生长速度

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

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。

表 5 各猴头菇品种栽培阶段菌丝长势和生长速度

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

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。

2、子实体生长情况

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。

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%）。

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。

表 6 不同品种猴头菇生物学性状和产量

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

3、子实体活性成分分析

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。

表 7 各品种猴头菇子实体多糖含量测定结果

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

5 综上所述实验，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。

猴 HE015 子实体表型如图 2 所示。

15 **实施例 3 猴 HE015 基因组测序与特异分子标记开发**

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：

1、基因组测序与组装

25 收集猴 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 20kb 以上的片段，经末端修复和加 A 尾后，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。

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。

2、全基因组重测序与 Indel 变异位点集获得筛选

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。

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。

3、特异性引物设计与 PCR 扩增

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：

- 5
- HE015-F2（SEQ ID NO.4）：GCAGTGGTCTCAAAGGCCAT，
HE015-R2（SEQ ID NO.5）：GAAACTTGGTGCTGCAGAGC；
HE015-F4（SEQ ID NO.6）：CGGGGTCTGGGATGAGACC，
HE015-R4（SEQ ID NO.7）：GAATGGGCAAATGAGGTCGGG；
HE015-F8（SEQ ID NO.8）：CCTGCAAGCCATCGGACGTA，
HE015-R8（SEQ ID NO.9）：CTTGGTCTACGCTACGTCC。

10

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 30μl）如表 8 所示。

表 8 猴 HE015 分子标记 PCR 体系

组成成分	用量（μL）
2x Taq Master Mix	15
DNA 模板（50 ng/μL）	2
正向引物（10μmol/L）	1
反向引物（10μmol/L）	1
ddH ₂ O	11

PCR 程序为：95℃预变性，95℃变性 15 sec，58℃退火 15sec，72℃延伸 15sec，GOTO step2，执行 32 个循环，72℃延伸 10 min。

15

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。

4、PCR 扩增结果与分析

（1）引物对 HE015-F8/R8 扩增结果如图 3 所示：

20

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）。

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。

SEQ ID NO.1 序列（HE015-F8/R8 扩增产物序列）：

- 25
- 30
- CCTGCAAGCCATCGGACGTATTGAGAAGTCCAAAATGAAGACGAAGA
AAGAAATCAGTAGATTGACAAGCAAGTGTCATAAGAGTTGGTCTCGTTGA
AGGAGAGCCGGA CTTGTGCGCGATATCGCAGAGCAATGGAAGCGAAAAG
ACGCGCATCGAGGGAGACGACGAAGGGACGAAAAAAGAAGGAGGGAA
GGGGGGGATGAAGATGAAGAAATTGAGAAAACAGCATCGGTGGCCGCAA
TAATCCCGTCGGCGTAGACACGGAAGCGAACAGGAAGCGAGCGCAGCGG

GTGTCTGAAGATACAGACAGTAATAGCAAAATGAACGCAGCAATGTTCCG
GTCGGAAGAAATGGCAATATGGGGGCAACGAATGGAAGGACAACCTCACA
ATGAAACGCACTGATGCCAATTAATTTGCAGATTGAGATCATTCTGTAGGA
CGTAGCGTAGACCAAG

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

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。

10 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。

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

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

CATAGGCCTGTGTCCACCCGGGCAGGCCGCCCGGGTTTTCGGGGTGT
AAGATCATAGCTCGCTCCCGGCGGGGCGCGTTTTCGGGGTTCAGGGTGT
GAACCTTTACCGGGATTATCAGGGGTCCTCGTTACACTCGCGTTACAGTTA
TTTATTTATTTAACGTTAGGCGCTCAGGACCCGACAGTGTTTCGGGAGTTTA
20 CCGGTTTTGAACATATATATGTACCTCCCTCAATACGCTAAACAACGTCT
TCTGTGTGAGGTCAGCAACGGAGATCAGATACCTCCCAGCTAAATATTTCG
AACTGTTCAATTTCTCGGGCAGATTTATCTAACC GGTTATATGCTATGGAC
GAGCAGATAAGCGTCTACTTAATCCTTCTGGCCCTTGACGTCCAACAGCCA
TTTCCCGACCTCATTTGCCCATTC

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

GCAGTGGTCTCAAAGGCCATCCCAGGCAGCTATGACGAGGTTCAGGT
GAAATATCGCAGCCAAGGCACCTCTTGCCCATTTGTATCTACAAAGCATAC
TGAAGGACGAGGCACACATTGCCTAGTGCCACAAGTAGAATCAATTTTAA
GACAGCTGCCCCAGCAGGTGGTATCAAACGTTTCAAGAATAGATCACAAA
30 TGAGGTGTTATCTTACAATCCCAACATGTCTGCATGCCTACATCTCATCAA
CAAGACCACTTTCCCGACCAAGTGCCCTACAATCTATCCAATATCTCCTTCC
ATTCCTTCACAAATTCTTGTTCACTTGGCAGCATTTTGACCTTCCATTTCGAC
AATACCTAGCTTTCCATGTGAATTGCACACTGCAAGCTCTCTCAACTTCTT
CTGATGGGCACCTTTGTTGCTCTGCAGCACC

35 综上所述结果：

(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。

(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
40 时均能扩出对应相同条带的为猴 HE015。

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。

实施例 4 猴 HE015 提取物的制备

1、猴 HE015 液体发酵培养物（HEF）的制备：

5 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）。

10 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：

猴 HE015 子实体粉碎后，加入 20 倍量纯化水，95 °C 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°C 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°C 静置 15 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）。

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：

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 20 25°C 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°C 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°C 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°C 静置 24h；下层沉淀经 80%乙醇、丙 25 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）。

实施例 5 猴 HE015 提取物对酒精性胃粘膜损伤具有改善作用

1、实验动物

雄性 KM 小鼠，SPF 级，体重 18-22g，5-6 周龄，饲养温度与湿度：23±1°C，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 30 的可靠性。小鼠自由进食饮水。

2、实验分组

雄性 KM 小鼠经适应性饲养 7d 后，随机分成如下 8 组：

空白对照组 1：正常组（Control）、
模型对照组 1：模型组（Model）、
给药组 1：阳性药组（Positive）、
给药组 2：猴 HE015 液体发酵培养物组（HEF）、
5 给药组 3：猴 HE015 子实体多糖提取物组（HEFP）、
给药组 4：猴 HE015 子实体小分子提取物组（HEFX）、
给药组 5：猴 HE015 固体培养菌丝体多糖提取物组（HESP）、
给药组 6：猴 HE015 固体培养菌丝体小分子提取物组（HESX），
模型组小鼠 14 只，其余各组小鼠 13 只，给予普通饲料喂养。

3、实验过程

实验为期 2 周：

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；

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。

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
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

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。

4、实验结果

（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

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。

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。

（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
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。

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。

（3）小鼠胃组织 HE 染色结果

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。

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。

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。

权 利 要 求 书

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。

5 2. 一种猴头菇菌剂, 其特征在于, 含有权利要求 1 所述新菌株猴 HE015。

3. 一种用于检测或鉴定权利要求 1 所述猴 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权利要求 1 所述猴 HE015 检测或鉴定试剂盒中的应用。
10

5. 一种用于检测或鉴定权利要求 1 所述猴 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,

15 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 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 HE015 的试剂盒, 其特征在于, 含有权利要求 5 所述引物。

20 8. 一种检测或鉴定权利要求 1 所述猴 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。

9. 一种猴头菇多糖提取物, 其特征在于, 由权利要求 1 所述猴 HE015 的子实体经水提醇沉法所得的沉淀。

10. 一种猴头菇小分子提取物, 其特征在于, 由权利要求 1 所述猴 HE015 的子实体经水提醇沉法所得的上清液。
25

11. 权利要求 1 所述猴 HE015、权利要求 2 所述菌剂、权利要求 9 所述猴头菇多糖提取物或权利要求 10 所述猴头菇小分子提取物在制备具有保护胃黏膜作用或具有治疗或改善酒精性胃粘膜损伤作用的产品中的应用。

12. 一种保护胃黏膜或改善酒精性胃粘膜损伤的产品, 其特征在于, 含有权利要求 9 所述猴头菇多糖提取物和/或权利要求 10 所述猴头菇小分子提取物。
30

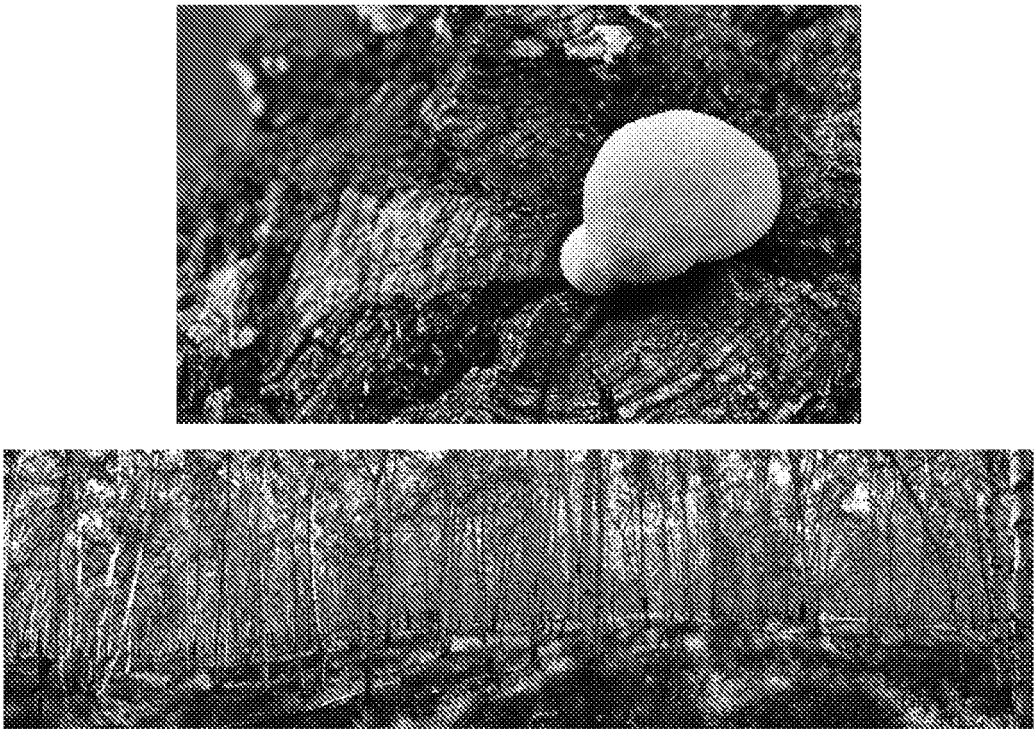


图 1

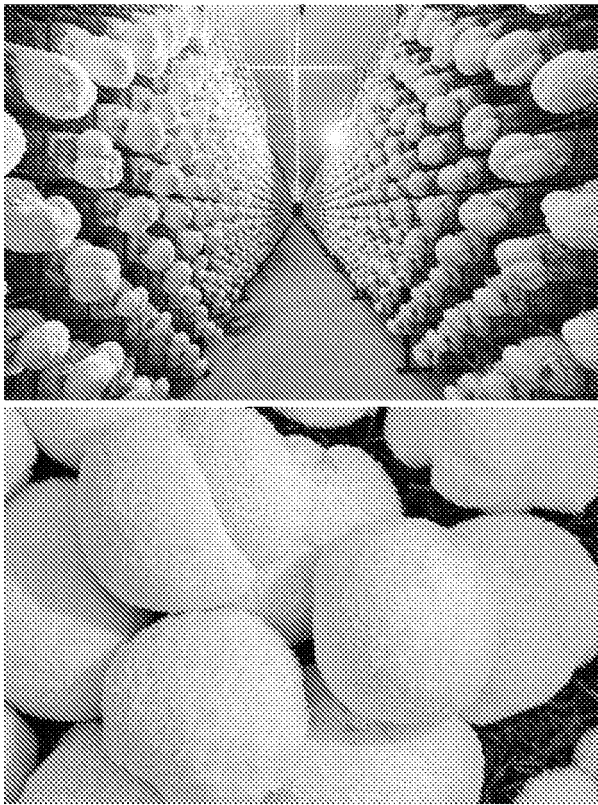


图 2

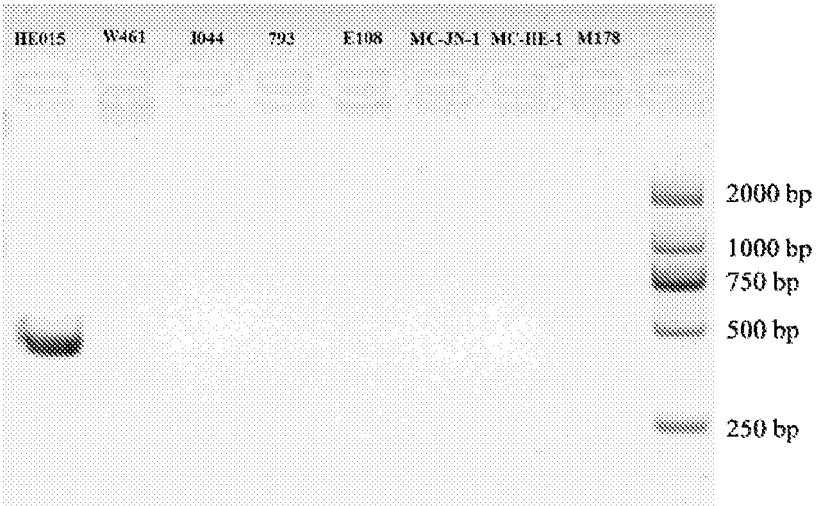


图 3

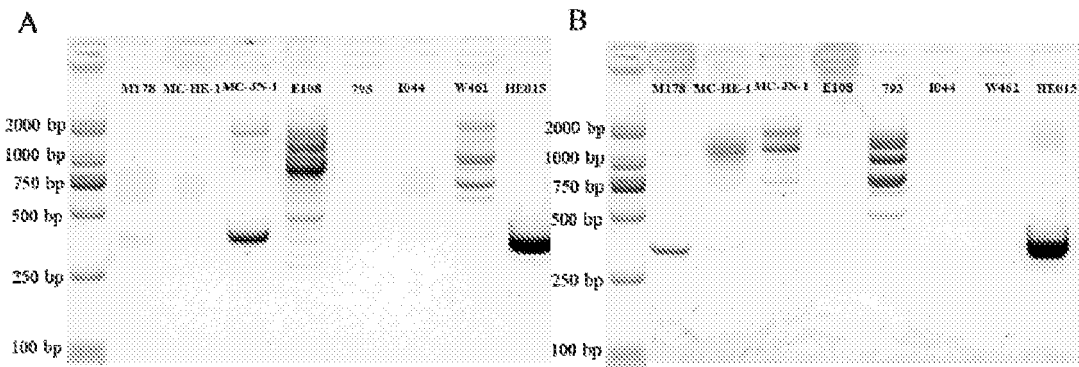


图 4

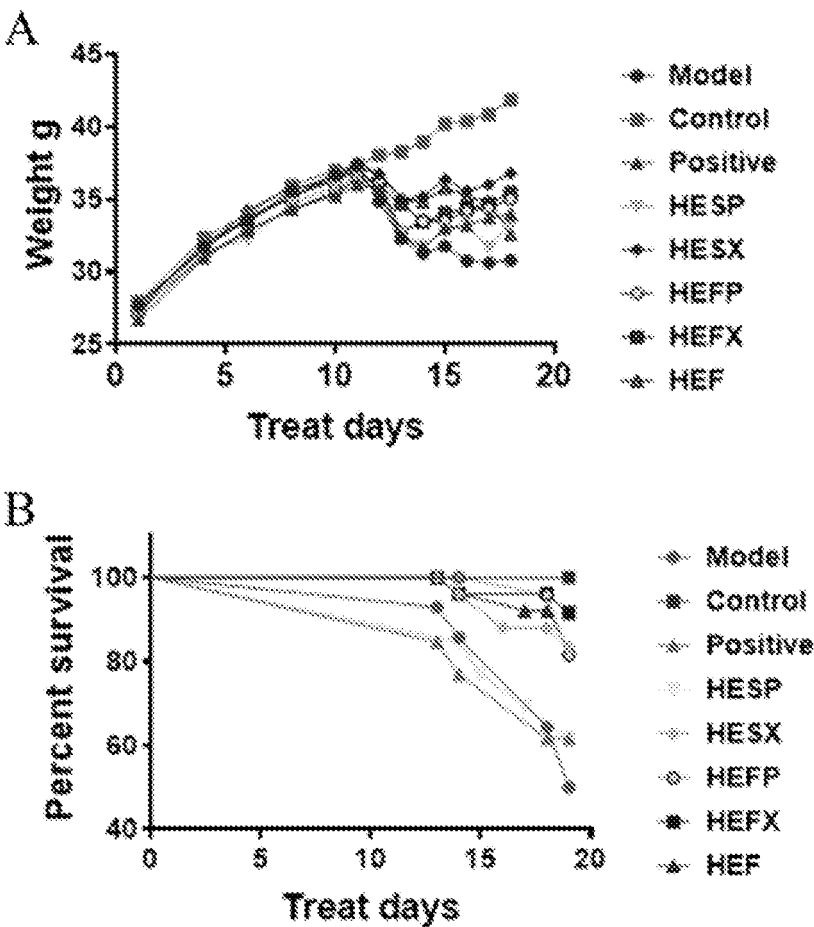


图 5

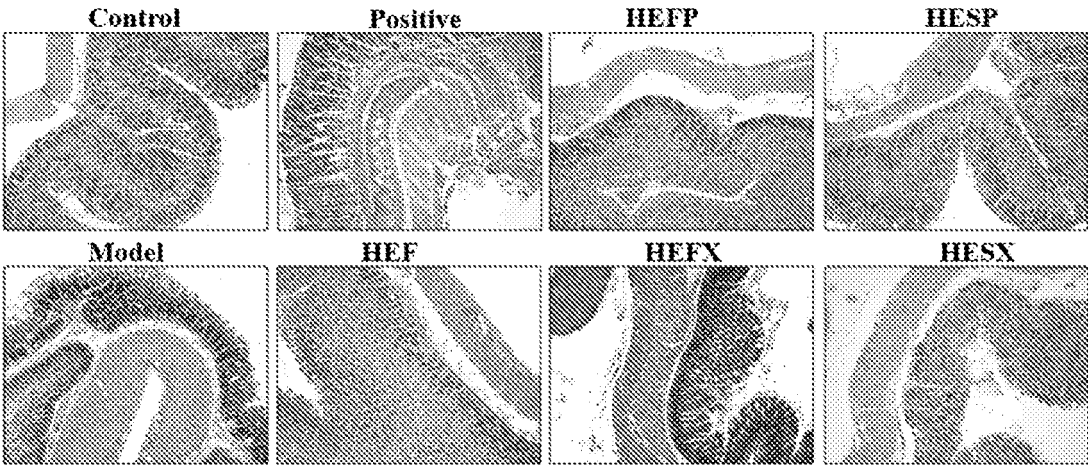


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/090037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/14(2006.01)i; A23L2/39(2006.01)i; A23L31/00(2016.01)i; A23L33/125(2016.01)i; C08B37/00(2006.01)i; C12Q1/6895(2018.01)i; C12N15/11(2006.01)i; C12R1/645(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C12N; A23L; C08B; C12Q; C12R Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT, ENTXTC, CNABS, VEN, ENTXT, CNKI, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE, NCBI_GenBank, STNext, 中国生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 刺猬菌, 分子标记, 猴菇, 猴蘑, 猴头菇, 猴头菌, 猴头蘑, 煎, 浸, 伤, 生长速度, 产量, 水, 损, 提, 胃, 杂菌, 粘膜, 煮, 猾菌, 广东省科学院微生物研究所, 广东省微生物分析检测中心, 无限极, GUANGDONG DETECTION CENTER OF MICROBIOLOGY, INSTITUTE OF MICROBIOLOGY GUANGDONG ACADEMY OF SCIENCES, INFINITUS, Gastric mucosa, injury, Hericium erinaceus, Stomach, lesion, damage, 周勇, YONG ZHOU, 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, SEQ ID NOs.1-9		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 117624397 A (NANJING UNIVERSITY OF FINANCE AND ECONOMICS) 01 March 2024 (2024-03-01) description, embodiments 1 and 4-6	9, 11-12
X	杨焱等 (YANG, Yan et al.). "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 (Comparison on Chemical Component and Biologic Activity of Hericium erinaceus Fruit body and Mycelial Eextracts)" 菌物研究 (Journal of Fungal Research), Vol. 4, No. 3, 31 December 2006 (2006-12-31), page 15, right-hand column, lines 1-10, page 17, table 3, and page 18, left-hand column, lines 6-12 and right-hand column lines 6-7, and table 4	9, 11-12
A	CN 102396346 A (INSTITUTE OF AGRICULTURAL RESOURCES AND REGIONAL PLANNING, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 04 April 2012 (2012-04-04) claim 1, and description, paragraphs 24, 33, and 52	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 December 2024		Date of mailing of the international search report 23 December 2024
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109938332 A (BLOOMAGE BIOTECHNOLOGY CORPORATION LIMITED et al.) 28 June 2019 (2019-06-28) description, paragraphs 54, 76, and 86	1-12
A	CN 101402994 A (FUJIAN AGRICULTURE AND FORESTRY UNIVERSITY) 08 April 2009 (2009-04-08) claim 1	1-12
A	CN 108575556 A (SHANGHAI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 28 September 2018 (2018-09-28) description, paragraphs 59-62	1-12
A	WO 2022195581 A1 (CANNABOTECH LTD.) 22 September 2022 (2022-09-22) claim 1, and description, embodiment 4	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/090037

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☐ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/090037

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	117624397	A	01 March 2024	None			
CN	102396346	A	04 April 2012	CN	102396346	B	11 September 2013
CN	109938332	A	28 June 2019	WO	2020177389	A1	10 September 2020
				CN	109938332	B	11 February 2022
CN	101402994	A	08 April 2009	CN	101402994	B	30 March 2011
CN	108575556	A	28 September 2018	CN	108575556	B	09 June 2020
WO	2022195581	A1	22 September 2022	US	2024189376	A1	13 June 2024
				EP	4308137	A1	24 January 2024

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☐ 作为国际申请的一部分提交的:
 - b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交 (细则13之三.1(a)) ,
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2. ☒ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

A. 主题的分类

C12N1/14(2006.01)i; A23L2/39(2006.01)i; A23L31/00(2016.01)i; A23L33/125(2016.01)i; C08B37/00(2006.01)i; C12Q1/6895(2018.01)i; C12N15/11(2006.01)i; C12R1/645(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N; A23L; C08B; C12Q; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNTEXT,ENTXT, CNABS, VEN, ENTXT, CNKI, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE, NCBI_GenBank, STNext, 中国生物序列检索系统: 刺猬菌, 分子标记, 猴菇, 猴蘑, 猴头菇, 猴头菌, 猴头蘑, 煎, 浸, 伤, 生长速度, 产量, 水, 损, 提, 胃, 杂菌, 粘膜, 煮, 猬菌, 广东省科学院微生物研究所, 广东省微生物分析检测中心, 无限极, GUANGDONG DETECTION CENTER OF MICROBIOLOGY, INSTITUTE OF MICROBIOLOGY GUANGDONG ACADEMY OF SCIENCES, INFINITUS, Gastric mucosa, injury, Hericium erinaceus, Stomach, lesion, damage, 周勇, YONG ZHOU, 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, SEQ ID NOs.1-9

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 117624397 A (南京财经大学) 2024年3月1日 (2024 - 03 - 01) 说明书实施例1、4-6	9、11-12
X	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, 第4卷, 第3期, 2006年12月31日 (2006 - 12 - 31), 第15页右栏第1-10行、第17页表3、第18页左栏第6-12行、右栏第6-7行、表4	9、11-12
A	CN 102396346 A (中国农业科学院农业资源与农业区划研究所) 2012年4月4日 (2012 - 04 - 04) 权利要求1、说明书第24、33、52段	1-12
A	CN 109938332 A (华熙生物科技股份有限公司 等) 2019年6月28日 (2019 - 06 - 28) 说明书第54、76、86段	1-12
A	CN 101402994 A (福建农林大学) 2009年4月8日 (2009 - 04 - 08) 权利要求1	1-12

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年12月13日

国际检索报告邮寄日期

2024年12月23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

李丹阳

电话号码 (+86) 010-53960619

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 108575556 A (上海市农业科学院) 2018年9月28日 (2018 - 09 - 28) 说明书59-62段	1-12
A	WO 2022195581 A1 (CANNABOTECH LTD.) 2022年9月22日 (2022 - 09 - 22) 权利要求1、说明书实施例4	1-12

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/090037

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	117624397	A	2024年3月1日	无	
CN	102396346	A	2012年4月4日	CN	102396346 B 2013年9月11日
CN	109938332	A	2019年6月28日	WO	2020177389 A1 2020年9月10日
				CN	109938332 B 2022年2月11日
CN	101402994	A	2009年4月8日	CN	101402994 B 2011年3月30日
CN	108575556	A	2018年9月28日	CN	108575556 B 2020年6月9日
WO	2022195581	A1	2022年9月22日	US	2024189376 A1 2024年6月13日
				EP	4308137 A1 2024年1月24日