

内部资料，请勿外传!!!

SHIME® MANUAL

LONG TERM SHIME® EXPERIMENTS



SHIME® is a registered trademark of ProDigest/UGent.

# 目录

- 1 SHIME® 技术平台背景
  - 1.1 胃肠道的体外建模
  - 1.2 人体肠道微生物生态系统模拟器(SHIME®)
  - 1.3 代谢物
  - 1.4 ProDigest 在实验设计中的支持
- 2 TWINSHIME 的操作
  - 2.1 SHIME 实验操作参数
  - 2.2 产品等级计算
  - 2.3 泵配置与反应容器布局
- 3 SHIME® 实验的运行
  - 3.1 构建一个 SHIME 实验系统
  - 3.2 实验启动
  - 3.3 接种后次日
  - 3.4 实验中
  - 3.5 实验末期
- 4 相关方案
  - 4.1 采样
  - 4.2 如何制备粪便接种物
  - 4.3 含冷冻保护剂的样本储存方法
  - 4.4 SHIME 实验培养基配置
  - 4.5 SHIME 实验中胰液/胃蛋白酶溶液的配置
  - 4.6 SHIME 实验用酸碱的制备
  - 4.7 黏蛋白微球的制备与更换

## 1 SHIME® 技术平台背景

### 1.1 胃肠道的体外建模

静态批次培养模型是一种用于快速筛选肠道过程的有效工具。然而，其环境条件高度简化，无法对变化的条件进行控制，因此仅适用于短期实验。最终验证应通过长期给药研究，在胃肠道连续模型中进行。此类模型能够在更具代表性的不同肠道区域条件下，较长时间地培养复杂的肠道微生物生态系统。此外，由于其分别模拟胃肠道和结肠的不同区段，这些模型不仅可获取发酵特征的详细信息，还能确定效应在肠道中的具体定位。另外，既往体外与体内研究表明，对益生元或益生菌特性的真实评估可能需要在产品连续施用 2 至 3 周后才能进行，因此该模型应能够模拟产品的重复摄入过程。

应用设计良好的胃肠道连续体外模型，例如动态人体肠道微生物生态系统模拟器 (SHIME)，能够深入研究特定分子的生物活性、益生菌的存活与功能，以及特定食品成分的可消化性及潜在益生元特性。此外，近年来体外模型技术的进展还使得在连续系统中可同时研究细菌与宿主的交互作用，如黏膜黏附以及免疫系统与细菌之间的相互作用，从而进一步提升其科学产出与应用价值。

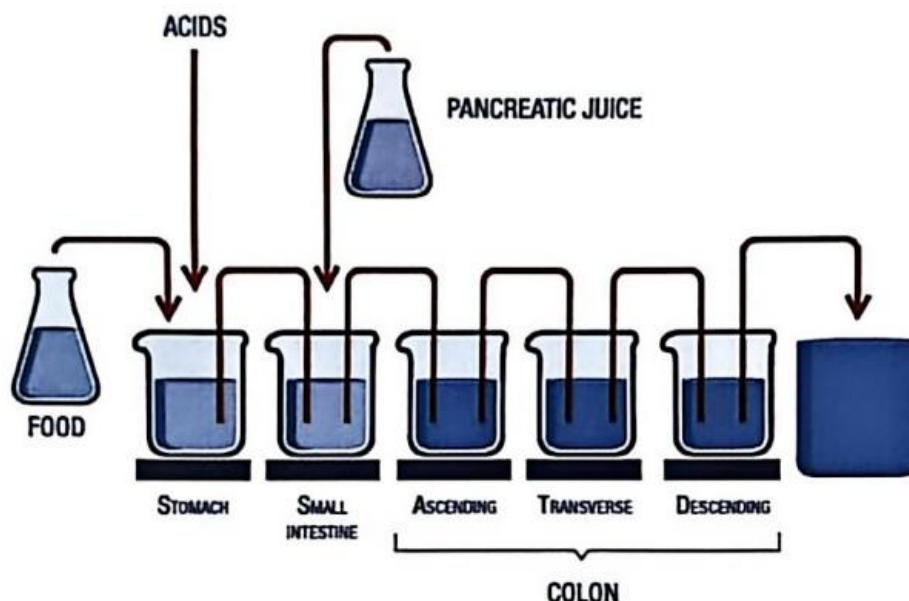
### 1.2 人体肠道微生物生态系统模拟器(SHIME®)

#### 1.2.1 SHIME 模型的介绍与设计

本反应器装置基于 SHIME®系统构建，旨在模拟成人胃肠道环境，具体设计参照 Molly 等人 (1993) 的描述<sup>[1]</sup>。SHIME 系统由五个串联反应器组成，分别模拟人体胃肠道的不同区段。前两个反应器采用“填充-排放”模式运行，以模拟食物摄入与消化过程的不同阶段：通过蠕动泵定时向胃隔室 (V1) 和小肠隔室 (V2) 分别注入一定量的 SHIME 培养基 (每日 3 次，每次 140 mL) 以及胰液和胆汁液体 (每日 3 次，每次 60 mL)，并在指定时间间隔后排空相应反应器。后三个隔室用于模拟大肠，采用连续搅拌模式运行，维持恒定容积与 pH 控制。各容器的保留时间与 pH 值均参照结肠不同区段的体内环境条件进行设定，最后三个容器的总停留时间为 72 小时。在接种粪便微生物群后，这些反应器分别模拟升结肠 (V3)、横结肠 (V4) 和降结肠 (V5)。接种物的制备、保留时间、pH 值、温度参数及反应器培养基组成均参照 Possemiers 等人 (2004) 的方法<sup>[1]</sup>。通过对环境因素与营养条件的严格控制，粪便接种物 (其为体内近端/远端结肠肠腔与黏液

微生物群的混合物)得以稳定形成代表不同结肠区域肠腔与黏膜微生物群的稳定群落。

SHIME®系统已在科研与工业项目中应用超过 20 年，并已通过多项体内参数验证。在结肠不同区域微生物群落稳定后，三个结肠隔室中会形成一个具有代表性的微生物群落，该群落在组成和功能上均因结肠区段的不同而存在差异。



标准化的模拟人体肠道微生物生态系统 (SHIME) 装置由五个串联反应器组成，分别模拟人体肠道不同区段的微生态环境。

为同步研究多种化合物，研究人员开发了一套 TWINSHIME®系统 (Van den Abbeele 等, 2010)<sup>2</sup>，通过并行运行两套装置实现该功能。两个系统所处环境因素保持一致，包括采用相同的 pH 与温度控制条件，并利用双头泵实现反应器间的液体传输。

<sup>1</sup> Possemiers S, et al.(2004) PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem.FEMS Microbiol Ecol.49(3):495-507

<sup>2</sup> Van den Abbeele P, et al.(2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX.Appl Environ Microbiol.76:5237- 5246

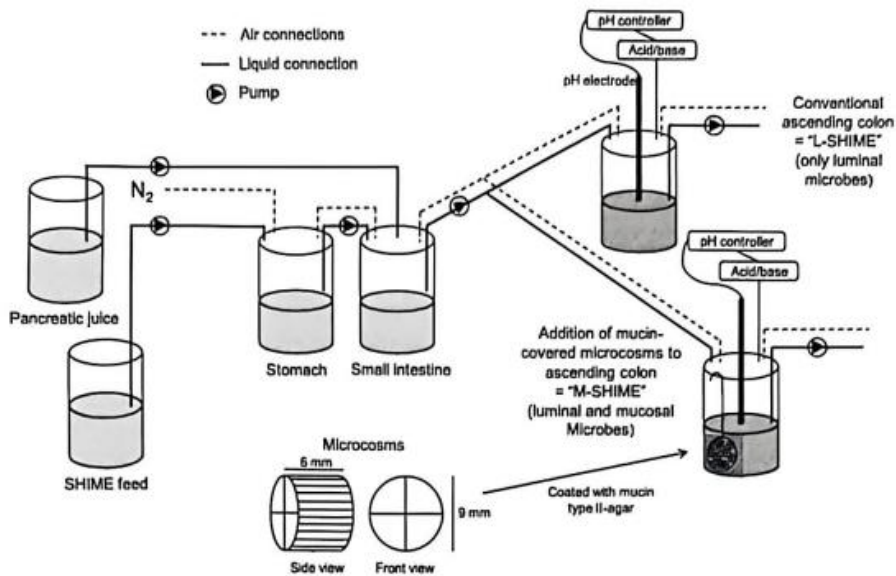


TWINSHIME\*系统概览，由两个平行的 SHIME 系统组成。每个 SHIME 反应器包含五个腔室，分别模拟胃、小肠、升结肠、横结肠和降结肠。

人体肠道内栖息着一个庞大而复杂的微生物群落，其通过阻止病原体定植及产生营养物质等方式参与维持人体健康。然而，微生物并非随机分布于肠道各处，其中附着于肠壁的微生物作为一道“屏障”发挥着重要作用：它们可抵御病原体、指导黏膜免疫应答，并通过占据生态位点排斥潜在有害定植菌。然而，当前体外培养策略尚无法实现对肠道黏膜附着微生物群体的培养，仅能模拟肠腔微生物群落。这意味着肠道生态系统的重要组成部分未被纳入研究范围，潜在的关键信息也因此丢失。

为解决这一问题，ProDigest 公司对 SHIME®系统进行了改进，开发出一种能够考虑黏液层定植过程的适应性模型（Van den Abbeele 等，2012 和 2013）<sup>3</sup>。这一被称为 M-SHIME®的系统在其领域内具有独特性，能够在数周时间内同时培养肠腔和黏液相关微生物群落。

<sup>3</sup>Van den Abbeele P,et al.(2012)Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli.Microb Biotechnol.5(1):106-15;Van den Abbeele P,et al.(2013) Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model.ISME J. 6(4):335-40



M-SHIME®系统是在标准 SHIME 模型基础上改进而成，通过在三个结肠区域中添加覆盖黏蛋白的微环境构建。能够黏附于黏液层的细菌将定植于这些微环境中，并在反应器中形成一个黏液区室。每三天更换一半的微环境，可模拟肠道中黏液层的更替过程，从而实现对黏膜区室的持续建模。此外，从收获的微环境中可分离出已黏附的细菌，进而对黏附菌群进行表征分析。

引入黏膜舱室可提升 SHIME®系统的应用价值与建模能力，使其能够评估益生元化合物的调节作用是否仅限于肠腔，或是否同时涉及黏附于黏液层的微生物群。

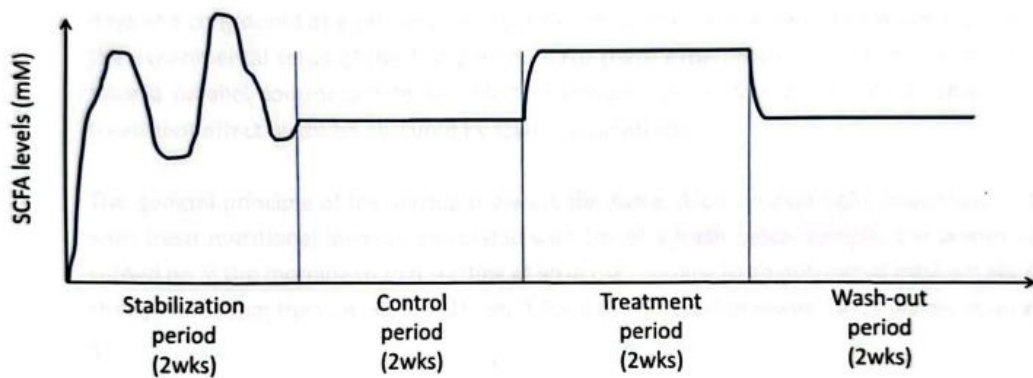
SHIME 系统可模拟多种肠道环境因素，包括婴儿、成人及老年人群的肠道状态，以及特定亚健康状态。后者涵盖对病原体感染的模拟，无论其是否与既往抗生素摄入相关。

### 1.2.2 SHIME 实验设计的考量

若需筛选多种化合物或细菌的活性，建议首先进行短期筛选实验。该方法有助于筛选出活性最高的成分，同时也可为确定相关浓度提供参考信息。在选定特定化合物及一种或几种相关浓度后，可通过更贴近生理条件的实验体系——即人体肠道微生物生态系统模拟器（SHIME）——评估其在长期重复给药条件下的效应。

### 1.2.2.1 时间线

SHIME 实验的时间流程通常包括一个稳定期（2 周），该阶段允许人类粪便接种物演化为稳定的体外微生物群落，以代表不同目标结肠区域。这一稳定过程至关重要，因为微生物从体内环境转移至实验室模型时需要适应过程。当微生物群落达到稳定后，可以完全确定所施加处理产生的影响仅源于处理本身，而非微生物对体外环境的适应。事实上，若未经过稳定化处理，处理效应与适应效应会同时发生，从而干扰对确切处理效应的观测。稳定期之后通常依次为对照期（1–2 周）、处理期（2–3 周）和清除期（1–2 周）。当然，具体实验设计可根据研究目的进行调整。



短链脂肪酸（SCFA）在整个 SHIME 实验过程中的假设性变化示例。在接种粪便样本后，微生物群落处于稳定化阶段，导致代谢物水平波动。两周后，系统达到稳定状态。此时可开始为期两周的对照期，以测定代谢物的基线水平。继之，启动为期两周的处理干预阶段，以便监测其效应。最后，可设置清除期以检验处理效应是否可逆。

在治疗期之前设置对照期虽是评估干预效果的可靠方法，但同时设置同步对照的 SHIME 单元亦具有重要价值。该设计不仅提供了第二种干预效果评估方式，在某些情况下（例如因人为失误导致实验出现微小误差时），仍可维持高质量的比较结果。以下列举长期实验中可能（但不应该）因人为错误导致问题的若干示例：

- 水浴连接装置密封不严导致渗漏，流入数字搅拌器内引发电气故障（在此问题解决前，系统处于停机状态，pH 值/温度无法调控，新鲜营养培养基/胰液无法正常输入等）。
- SHIME 培养液/胰液配制过程存在多次人工操作环节，人为失误（例如：将 15 g 粉末误加入 2 L 水中而非规定的 1 L 水）可能导致实际成分出现

偏差，进而影响 SHIME 系统中的微生物群落组成。

- 其他实验误差，如软件错误、温水循环器故障（例如因未及时补充导致水位过低）等。

当设置平行对照时，处理组和对照组同时受到相同干扰，因此在实际操作中，两组仍可进行比较。这种方式至少优于与时间上的对照（即前期对照阶段）进行比较。

注意：

如下文所述，M-SHIME 实验有时需限制在 3 天内。为避免在 M-SHIME 初始优化/验证过程中开启腔盖，实验中未更换载体微珠，因此实验必须在三天后终止（此时载体微珠上已形成成熟生物膜）。进行短期 M-SHIME 实验的另一原因可能涉及生物安全问题，例如在操作危险病原体试验时，应尽量避免开启培养腔室。在此情况下，SHIME 实验可缩短至三天，并视为一种 pH 控制的短期批次实验（实际上这也是 TIM-2 模型的实验设置方案）。进行此类实验时，设立平行对照单元以进行比较至关重要。需要说明的是，处理效应可能会因系统稳定化效应而被掩盖。

该系统的启动流程始终遵循统一标准。经过 16 小时过夜培养（使用接种了 5%新鲜粪便样本的新鲜营养培养基）后，于上午 9 时启动泵组，使新鲜营养培养基开始持续输入系统。此后每日定时（1 时、9 时、17 时）进行三次循环操作，每个循环均包含以下步骤：

- 向胃内灌注营养培养基（0 小时）
- 将胃内悬浮液转移至小肠（1 小时 30 分钟）
- 向小肠内添加胰液（1 小时 30 分钟）
- 将小肠悬浮液转移至升结肠（3 小时）
- 将升结肠悬浮液转移至横结肠（3 小时）
- 将横结肠悬浮液转移至降结肠（3 小时）
- 将降结肠悬浮液转移至废液收集处（3 小时）

因此，细菌在每个周期开始后 3 小时获得新的营养物质。因此，它们在例如 4–7 小时、12–15 小时以及 20–23 小时期间最为活跃。因此，在以下情况下需充

分考虑该周期性活性特征：

- 采样：应始终选择固定的时间点进行采样，且不得偏离该时间点。如第 5.1 节所述，通常建议在新饲料到达结肠前（即 12 小时前，例如 11 时 30 分）采集样本。若因故某日未能完成采样，仍可考虑在 19 时 30 分或 3 时 30 分采集类似样本，但需注意每日存在三个以 8 小时为周期的循环规律。
- 评估电力故障的潜在影响：在泵未运行且微生物活性较低的时间段（例如 23:00–1:00、7:00–9:00、15:00–17:00），其影响将相对较小。

#### 1.2.2.2 连续结肠区域的选择

根据研究问题的不同，研究者可选择针对不同结肠区域（具体方案见后文图示）的差异化实验设计：

- 三个连续的结肠区域：升结肠（pH=5.75–5.95，容积=500 mL）、横结肠（pH=6.15–6.4，容积=800 mL）和降结肠（pH=6.6–6.9，容积=600 mL）<sup>4</sup>。

该配置允许并行运行两个单元，称为 TWINSHIME。

- 两个连续的结肠区域：近端结肠（pH=5.75–5.95，容积=500 mL）和远端结肠（pH=6.6–6.9，容积=800 mL）。

该配置允许并行运行三个单元，称为 TRIPLESHIME。

省略第三个结肠区域的依据：在 TWINSHIME 系统中，食物成分或益生菌的作用多数已在升结肠或横结肠中观察到。这两个区域的总滞留时间已达 52 小时（分别为 20 小时和 32 小时），因此在进入降结肠额外 24 小时滞留之前，大部分效应已经发生。横结肠与降结肠在微生物组成上的相似性也支持这一设置。

- 一个结肠区域（可根据研究需要选择 pH 和容积）<sup>5</sup>。

该配置允许并行运行多个单结肠单元，称为 MULTISHIME。

<sup>4</sup>Van den Abbeele P, et al. (2010) Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Appl Environ Microbiol.* 76:5237- 5246

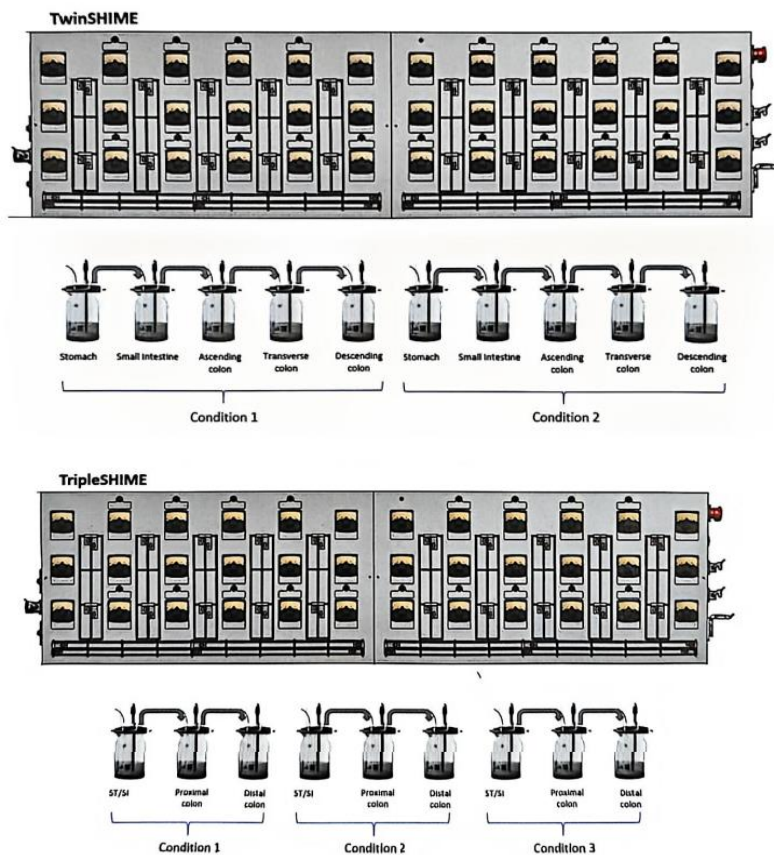
<sup>5</sup>Van den Abbeele P, et al. (2013) Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J*, 6(4):335-40

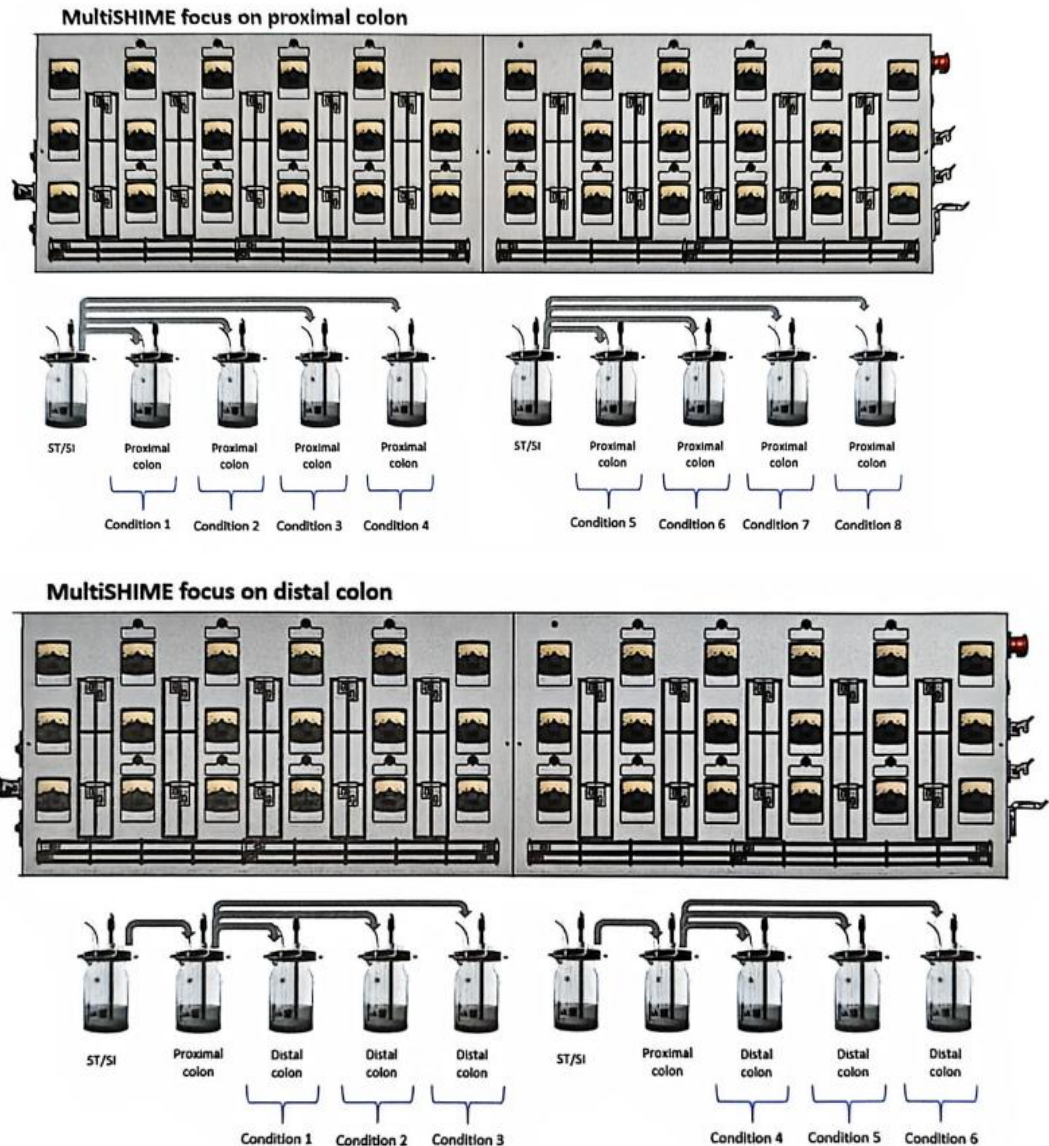
注意:

若仅关注单一结肠区域, 则可同时运行 6 至 8 个平行 SHIME 单元; 而若需评估全部三个结肠区域的影响, 则仅能使用 2 个平行单元。通过减少连续结肠区域的数量, 可在单次实验中纳入更多平行单元, 以评估不同处理方式、不同接种物或验证特定效应的可重复性。由于实验设计中强烈建议设置对照单元, 这意味着在 TWINSHIME 体系中仅能对某一处理设置一个重复。因此, 采用近端/远端结肠并联的实验设计常为更优选择, 该方案可实现对处理组和/或对照组的双重重复实验。

在 TWINSHIME 系统中, 胃和小肠分别模拟于两个不同的物理隔室中; 而在 TRIPLESHIME 系统中, 胃和小肠需模拟于同一物理隔室中。若平行结肠单元数量增加至六个, 则需要由同一胃/小肠隔室向多个结肠区域供料, 其示意图如下所示:

在单一体外消化腔室中进行胃/小肠孵育时, 唯一细微差异在于: 小肠孵育阶段的初始胆汁盐/胰酶浓度较低, 随后逐渐达到相同的终浓度。





### 1.2.2.3 SHIME 模型接种

在 SHIME 实验中使用粪便接种物也是一个值得探讨的议题。由于每个人类受试者都具有独特的肠道菌群，众所周知，不同个体对特定治疗可能产生不同反应。这一现象在体内实验中成立，因此显然也适用于 SHIME 等体外模拟实验。值得注意的是，研究已证实个体间整体微生物组成的差异在 M-SHIME 模型中得以保持<sup>6</sup>。具体而言，若某人 A 粪便样本中的微生物 X 含量高于某人 B，则该微生物在 A 来源的 SHIME 菌群中也占据更主导地位。这是利用 SHIME 模型研究个体间差异的重要前提。除保留整体微生物组成差异外，研究还证明 SHIME 模型相较于初始接种物保留了特定代谢功能。例如，研究表明只有体内能将异黄酮（IX）高效转化为 8-戊基萘酚（8-PN）的供体，其建立的 SHIME 菌群才能实现

该植物雌激素的高转化率<sup>7</sup>。虽然 SHIME 系统更适用于机制研究——旨在揭示微生物过程的具体作用机制——但它同样可用于探究此类机制在个体间的差异表现。

需要强调的是，强烈建议使用单一人源粪便样本接种 SHIME 模型。尽管有人认为混合粪便样本有助于获得代表所有不同样本的综合结果，但此种做法完全无效。原因在于，每个个体都具有相似的肠道生态位结构。不同微生物（如活厌氧瘤胃球菌（*Ruminococcus gnavus*）或阿克曼黏液菌（*Akkermansia muciniphila*）会在不同宿主体内占据特定生态位（如黏液降解），从而导致微生物群落组成存在个体间差异。在个体内部，其微生物群落随时间保持相对稳定<sup>8</sup>，表明每个个体拥有由特定微生物组成的菌群，这些微生物通过协同作用降解植物多糖、黏液素等。若将 10 个不同个体的接种样本混合，不仅无法获得“超级接种物”，反而会形成一种人工合成的第 11 种微生物群落；该群落需要更长时间才能稳定，因为大量占据相似生态位的微生物被聚集在一起，需通过竞争重新占据特定生态位。最终得到的仅是混合粪便样本中微生物的简单集合。过去，法国农科院（INRA）曾采用混合粪便接种无菌动物（个人交流），但因该人工菌群难以在动物体内成功定植且稳定性低于单一个体来源的菌群，此技术已被摒弃。因此，若研究目标为探讨个体间差异，建议采用不同单一接种样本分别接种多个 SHIME 系统。

需要指出的是，尽管特定受试者的人体微生物群在时间尺度上相对稳定，但个体粪便样本的微生物组成仍会因饮食、药物使用等因素而随时间波动。因此，即便使用同一人不同时间点的粪便样本进行重复的 SHIME 实验，也不能视为完全相同的重复实验，因为接种物本身已随时间发生变化。相反，若在同一时间采用同一接种物对多个 SHIME 单元进行接种，其结果则具有高度可重复性。因此，若需进行直接比较，所有反应器应在同一时间接种并平行运行。

<sup>6</sup>Van den Abbeele P. et al. (2013) Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. ISME J. 6(4):335-40

<sup>7</sup>Possemiers S. et al. (2006) The Prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops (*Humulus lupulus* L.) Is Activated into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin In Vitro and in the Human Intestine. J. Nutr. 136(7):1862-67

<sup>8</sup>Claesson et al. (2010) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. PNAS. 108:4586-91

为提高实验间重复性，可在冷冻保护剂（如甘油）存在下将粪便匀浆保存于-80°C，并用于 SHIME 模型的连续接种。在 ProDigest 实验室，通常不采用该方法，因冻融过程可能导致重要微生物物种的丢失。然而，多项 SHIME 研究在无法获取新鲜粪便接种物（例如炎症性肠病（IBD）患者样本）的情况下表明，特定的保存方法可保留其主要功能特性<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.2.2.4 粘膜环境的结合

如上文所述，当研究者不仅关注肠道内容物（luminal）过程，还需研究黏膜相关过程时，可采用人肠道微生物生态系统黏膜模拟系统（Mucosal-Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem, M-SHIME）（Van den Abbeele 等，2012 & 2013）<sup>11</sup>。该系统是一种半连续体外模型，可同时模拟肠道内容物与黏膜区域的微生物群落。作为该领域的独特平台，M-SHIME 能够在数周时间内同时培养内容物相关和黏液相关的微生物群落。

M-SHIME 与 L-SHIME 的区别在于前者引入了覆有黏蛋白的微环境载体。为模拟黏液层的更新，这些载体每 2-3 天更换一次。由于更换操作需开启反应器，操作者须迅速完成，并在之后彻底冲洗顶部空间。尽管目前已发表的 M-SHIME 实验多为短期（3-10 天），但该系统在多次长期实验中也表现良好。

需特别注意的是，在进行短期 M-SHIME 实验时，应使用糖类耗尽型 SHIME 营养培养基，以便在接种后实现较为温和的碳水化合物发酵过程。此外，研究者应认识到此类短期实验无法实现群落的充分稳定，而群落的稳定对于排除粪便微生物对体外环境因素的适应至关重要。更重要的是，在此类短时间框架下，近端结肠与远端结肠之间观察到的差异主要依赖于 pH 值，而非特定营养条件（例如，2-3 天的孵育无法达到远端结肠的营养耗尽状态）。因此，这类短期实验更类似于批式实验，而非真正的 SHIME 实验。

<sup>9</sup>Vermeiren et al.(2011)Decreased colonization of fecal Clostridium coccooides/Eubacterium rectale species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment.FEMS Microbiol Ecol 79: 685-696

<sup>10</sup>Visgnaes et al.(2013)Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus,Scientific Reports

<sup>11</sup>Van den Abbeele P,et al.(2012)Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli.Microb Biotechnol.5(1):106-15;Van den Abbeele P,et al.(2013) Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model.ISMEJ. 6(4):335-40

M-SHIME 的管腔微生物群与 L-SHIME 的管腔微生物群相似。因此，尽管管腔微生物群的影响可在 M-SHIME 或 L-SHIME 体系中得到类似研究，但黏膜微生物群的影响仅能在 M-SHIME 中进行研究。除了研究这一额外微生物群所带来的附加价值外，M-SHIME 的缺点还包括其较高的劳动强度。除了需制备包被微珠外，在定期更换微珠过程中（需开启反应器，每周 3 次），还需采取多项措施以维持厌氧环境。尽管通常需在 L-SHIME 与 M-SHIME 体系之间作出选择，但有时并行设置 L-SHIME 单元和 M-SHIME 单元亦具有一定意义，以便观察黏膜黏附微生物群所产生的附加效应。

#### 1.2.2.5 SHIME®生长介质

另一个需要做出的选择是营养培养基的使用。虽然许多消耗品可通过本地经销商订购，但此类特定的 SHIME 生长培养基可由 ProDigest 提供。在 ProDigest，原料以大批量采购，并采用专业粉末混合设备制备出高质量、均一的混合粉末。这不仅提供了即用型预混料，而且由于大批量采购所带来的竞争优势，ProDigest 能够以与通过 Sigma 等渠道单独订购各组分相当甚至更低的价格，提供此类最终高质量混合物。这些混合物的质量已通过验证，适用于 SHIME 系统。下文提出了六种不同类型的生长培养基。

备注：SHIME 营养培养基 1/2/5/6 所含的成分通常不被小肠吸收，因而进入结肠可供发酵利用，因此可不经透析直接使用。培养基 3 和 4（目前已停用）还含有大量婴儿配方奶粉，在进入 SHIME 结肠隔室前需进行透析处理。

其中两种培养基用于成人模拟：一种用于常规 L-SHIME 实验，另一种用于 M-SHIME 实验。其余四种培养基用于婴儿 SHIME 实验。第三和第四种培养基包含由 De Boever 等人（2001）[12]开发的配方，而第五和第六种培养基则包含于 2014 年 1 月新开发的婴儿 SHIME 饲料。后者的开发旨在进一步提高婴儿 SHIME 模型的潜在相关性。新开发婴儿 SHIME 饲料的基本原理在于：De Boever 等人（2001）开发并验证的婴儿 SHIME 饲料含有高负荷的婴儿配方奶粉，这些成分在体内很大程度上被降解和吸收。实际上，Le Blay 等人（2010）[13]报告指出，婴儿配方奶粉包含乳糖、酪蛋白和乳清蛋白（比例=12:1:1），这些成分的吸收率分别为 98%、98%和 80%，导致进入近端结肠时的最终比例为 12:1:15。据

此进行了如下计算：

	传统婴儿 配方奶粉 成分 (g/100g)	婴儿配方 奶粉 (ratio)	被消化/吸 收的部分 (%)	消化/吸收 婴儿配方 奶粉 (g/100g)	进入结肠 的未消化 部分 (g/100g)	进入结肠未消化 的部分(ratio)
乳糖	72	12	98	70,56	1,44	12
酪蛋白	6	1	98	5,88	0,12	1
乳清蛋白	9	1,5	80	7,2	1,8	15

与 De Boever 等人 (2001) 采用的需经消化/吸收的高浓度婴儿配方奶粉 (30 g/L) 不同, 本研究新开发的培养基充分考虑了上述因素, 以 12:1:15 的比例添加了 5 g/L 的明确化合物。选择 5 g/L 的浓度旨在使对照组饲料的总营养水平与成人 SHIME 培养基 (含 15.5 g/L 营养物质) 处于同一范围。事实上, 通过添加 5 g/L 经消化的婴儿配方奶粉组分, 我们最终得到 15.2 g/L 的总营养物质。按 12:1:15 的比例配制的 5 g/L 化合物中, 包含 2.1 g/L 乳糖、0.2 g/L 酪蛋白及 2.7 g/L 乳白蛋白 (消化后主要乳清蛋白)。

关于培养基, 需要重点考虑的是, 一次 TWINSHIME 实验每周约消耗 6 升生长培养基 ( $0.14 \text{ 升/次} \times 2 \text{ 个平行单元} \times 3 \text{ 次/天} \times 7 \text{ 天/周} = 5.88 \text{ 升}$ ), 一项为期 8 周的实验将需要 48 升培养基。类似地, TRIPLESIME 实验每周消耗约 9 升生长培养基 ( $0.14 \times 3 \times 3 \times 7 = 8.82 \text{ 升}$ ), 8 周实验需 72 升培养基; 而 MULTISHIME 实验每周消耗约 18 升生长培养基 ( $0.14 \times 6 \times 3 \times 7 = 17.64 \text{ 升}$ ), 8 周实验需 144 升培养基。下表最后三列显示了完成一项为期 8 周的 TWIN/TRIPLE/MULTI-SHIME 实验所需粉末 (每盒 500 克) 的盒数。

12 De Boever et al.(2001)

13 Le Blay et al.(2010)Set up of a new in vitro model to study dietary fructans fermentation in formula-fed babies. BrJ Nutr,103:403-411

编码	培养基	重量	成分 (g/L)	8 周 TWIN- SHIME	8 周 TRIPLE- SHIME	8 周 MULTI- SHIME
PD- NM001A	成人 L- SHIME 生长 培养基 (无 淀粉)	500 克混合物 可配制 43 升。 另提供独立包 装的 200 克淀 粉用于对照期 给药。	阿拉伯半乳聚糖 (1.2)、果胶 (2)、 木聚糖 (0.5)、葡萄糖 (0.4)、酵母提 取物 (3)、特殊蛋白胨 (1)、黏蛋白 (3)、L-半胱氨酸盐酸盐 (0.5)、淀粉 (0; 必要时以 4 g/L 补充)	1,2 boxes	1,7 boxes	3,4 boxes
PD- NM0D1B	成人 L- SHIME 生长 培养基 (含 淀粉)	500 克混合物 可配制 32 升。	阿拉伯半乳聚糖 (1.2)、果胶 (2)、 木聚糖 (0.5)、葡萄糖 (0.4)、酵母提 取物 (3)、特殊蛋白胨 (1)、黏蛋白 (3)、L-半胱氨酸盐酸盐 (0.5)、淀粉 (4)	1,6 boxes	2,3 boxes	4,6 boxes
PD- NM002A	成人 M- SHIME 生长 培养基 (无 淀粉)	500 克混合物 可配制 47 升。 另提供独立包 装的 200 克淀 粉用于对照期 给药。	阿拉伯半乳聚糖 (1.2)、果胶 (2)、 木聚糖 (0.5)、葡萄糖 (0.4)、酵母提 取物 (3)、特殊蛋白胨 (1)、黏蛋白 (2)、L-半胱氨酸盐酸盐 (0.5)、淀粉 (0, 必要时以 4 g/L 补充)	1,1 boxes	1,6 boxes	3,1 boxes
PD- NM002B	成人 M- SHIME 生长 培养基 (含 淀粉)	500 克混合物 可配制 34.2 升。	阿拉伯半乳聚糖 (1.2)、果胶 (2)、 木聚糖 (0.5)、葡萄糖 (0.4)、酵母提 取物 (3)、特殊蛋白胨 (1)、黏蛋白 (2)、L-半胱氨酸盐酸盐 (0.5)、淀粉 (4)	1,5 boxes	2,2 boxes	4,3 boxes
PD- NM005	婴儿 L- SHIME 生长 培养基:	500 克混合物 可配制 29 升。	果胶 (1)、葡萄糖 (1)、淀粉 (1)、 纤维二糖 (1)、蛋白胨 (2)、黏蛋白 (6)、乳糖 (2.1)、酪蛋白 (0.2)、乳 清蛋白- $\alpha$ -乳白蛋白 (2.7)、L-半胱氨 酸盐酸盐 (0.2)	1,7 boxes	2,5 boxes	5,0 boxes
PD- NM006	婴儿 M- SHIME 生长 培养基:	500 克混合物 可配制 32.5 升。	果胶 (1)、葡萄糖 (1)、淀粉 (1)、 纤维二糖 (1)、蛋白胨 (2)、黏蛋白 (4)、乳糖 (2.1)、酪蛋白 (0.2)、乳 清蛋白- $\alpha$ -乳白蛋白 (2.7)、L-半胱氨 酸盐酸盐 (0.2)	1,6 boxes	2,3 boxes	4,4 boxes
PD- NM008	婴儿 M- SHIME 生长 培养基 (液 体配方)	500 克混合物 可配制 32.8 升。	酵母提取物 (1)、黏蛋白 (4)、L-半 胱氨酸 (0.2)、乳糖 (4.8)、酪蛋白 (0.5)、乳清蛋白- $\alpha$ -乳白蛋白 (4.6)	1,6 boxes	2,3 boxes	4,4 boxes
PD- NM0012	婴儿 L- SHIME 生长 培养基 (液 体膳食配 方)	500 克混合物 可配制 29.2 升	酵母提取物 (1)、黏蛋白 (6)、L-半 胱氨酸 (0.2)、乳糖 (4.8)、酪蛋白 (0.5)、乳清蛋白- $\alpha$ -乳白蛋白 (4.6)	1,7 boxes	2,5 boxes	5 boxes

### 1.3 代谢物

在诸如 SHIME（模拟人体肠道微生物生态系统）的动态系统中，可对多种微生物活性指标进行监测。这些代谢产物经由多步中间反应及多种酶促途径生成，且不同微生物在此过程中均发挥作用。

复杂碳水化合物或淀粉经发酵后产生短链脂肪酸（SCFAs），其中以乙酸、丙酸和丁酸含量最为丰富。尽管这些短链脂肪酸的摩尔比随纤维来源及微生物发酵群落组成的不同而变化，但其相对含量总体上表现为乙酸 > 丙酸 > 丁酸。每一种短链脂肪酸均对黏膜及机体稳态具有重要作用：丁酸是结肠黏膜的能量来源，乙酸可抑制食欲并促进脂肪生成，丙酸则抑制胆固醇合成。三者均具有多种共同的抗炎及抗肿瘤特性。这些短链脂肪酸可通过气相色谱-氢火焰离子化检测器（GC-FID）进行定量分析。

乳酸是糖酵解发酵的中间代谢产物，由乳酸菌生成，可通过分光光度法进行测定。

除糖酵解发酵外，还存在蛋白水解发酵。二者不同之处在于，蛋白水解发酵除了从碳骨架生成多种与糖酵解相同的短链脂肪酸外，还会释放出具有潜在毒性的含氮及含硫代谢产物（如氨）。高浓度氨会干扰细胞代谢，具有细胞毒性，并可诱发炎症及上皮增生<sup>14</sup>。在 SHIME 实验中，氨也可作为代谢产物通过蒸汽蒸馏后滴定法进行检测。

### 1.4 PRODIGEST 在实验设计中的支持

根据已签署合同中的约定，ProDigest 将提供相应技术支持。如需协助，请通过 [support@prodigest.eu](mailto:support@prodigest.eu) 进行咨询，我们将及时予以答复。若遇紧急情况，亦可直接致电 ProDigest 办公室（+3292411190）处理。[耗材采购订单请发送至 purchase@prodigest.eu](mailto:purchase@prodigest.eu)。

<sup>14</sup>o'Keefe et al.(2016) Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer. *Gastroenterology & hepatology* 13:691-706

## 2 TWINSHIME® 的操作

### 2.1 SHIME 实验的操作参数

营养介质/胰液

Adult/baby SHIME	L or M-SHIME	Type of nutritional medium (Section 1.2.2.5 and 5.3)	pH
Adult	L	PDNM001A/B	2
	M	PDNM002A/B	2
Baby 0-3M (only milk)	L	PDNM0012	3
	M	PDNM008	3
Baby 6-24 M	L	PDNM005	3
	M	PDNM006	3

Adult/baby SHIME	Type of pancreatic juice
Adult	12.5 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 6g/L oxgall, 0.9 g/L pancreatin
Baby	2.5 g/L NaHCO <sub>3</sub> , 4g/L oxgall, 0.9 g/L pancreatin

体积和 pH 区间

Host	Configuration	Intestinal compartment	Volume (mL)	pH interval	
				Value	Time (after start of the cycle)
Adult SHIME	Twin	Stomach*	140	1,8-2,2	0h30 – 0h40
		Small intestine*	200	6,5-7,1	2h30-3h
		Ascending colon	500	5,75 - 5,95	Continuous
		Transverse colon	800	6,15 - 6,40	Continuous
		Descending colon	600	6,6 - 6,9	Continuous
	Triple	Stomach*	140	1,8-2,2	0h30 – 0h40
		Small intestine*	200	6,5-7,1	2h30-3h
		Proximal colon	500	5,75 - 5,95	Continuous
		Distal colon	800	6,6 - 6,9	Continuous
		Baby SHIME	Twin/Triple	Stomach*	140
		Small intestine*	200	5,7-6,3	2h30-3h
		Proximal colon	300	5,8 - 6,0	Continuous
		Distal colon	500	6,0 - 6,5	Continuous

胃/小肠容积系指各隔室处于最大充盈状态时的容积。

## 时间和泵速

Liquid transfer	Pump speed	Time scheme		
		After start of each cycle	Actual time schemes	
Nutritional medium	4,67 mL/min during 30 min (total volume = 140mL)	0.00-0.30	1.00 - 1.30	
			9.00 - 9.30	
			17.00 - 17.30	
Pancreatic juice	4 mL/min during 15 min (total volume = 60mL)	1.30-1.45	2.30 - 2.45	
			10.30 - 10.45	
			18.30 - 18.45	
Stomach – Small intestine	3,5 mL/min during 1h15 min (262.5 mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 140mL)	1.30-2.45	2.30 – 3.45	
			10.30 – 11.45	
			18.30 – 19.45	
Small intestine – First colon region	3.5 mL/min during 1h15 to 1h45min depending on the transfer action  (262.5 mL can be pumped during this 1h15min interval, which is sufficient to transfer the 200mL)	3.00-4.15	4.00 - 5.15	
First region – second colon region			3.00-4.25	12.00 - 13.15
				20.00 - 21.15
Second region – third colon region		3.00-4.35	4.00 - 5.25	
			12.00 - 13.25	
Final colon region – Waste		3.00-4.45	20.00 - 21.25	
			4.00 - 5.35	
			12.00 - 13.35	
			20.00 - 21.35	
			4.00 - 5.45	
			12.00 - 13.45	
			20.00 - 21.45	

注意：为实现更精确的胃排空模拟，可调整胃-小肠泵送方案以模拟更长时间框架内胃内容的渐进式排空。实际操作中，经过 30 分钟静态孵育后，胃内悬浮物以两个线性脉冲形式转移至小肠。

Stomach – Small intestine	3.5 mL/min during 20min and 30min (185 mL can be pumped during these intervals, which is sufficient to transfer the 140mL)	0.40-1.00; 2.00-2.30;	1.40 - 2.00
			3.00 - 3.30
			9.40 - 10.00
			11.00 - 11.30
			17.40 - 18.00
			19.00 - 19.30

- 在相邻结肠区室之间进行液体转移的泵同时启动。最初，仅“小肠-第一结肠区室”泵执行液体转移功能。当悬浮液加入第一结肠区室后，“第一结肠区室-第二结肠区室”泵开始向第二结肠区室输送液体，后续区室依此类推。
- 时间间隔应尽可能缩短，以避免废液泵从系统中抽取过多空气导致负压形成，进而使环境中的空气泄漏进入 SHIME 系统。时间间隔的设置需保证整个循环可在单工作日内完成监测。若首日发现液体转移未完全结

束（可能因特定管路设置稍长导致），应增加泵工作时间间隔的持续时间。若实际体积与预期值存在较大偏差，需考虑对相应泵进行重新校准。

- 此外，时间间隔的设置还需确保午夜后一小时内无任何操作指令，该要求与软件暂停功能密切相关。如软件手册所述，SHIME 运行可随时暂停与重启，此时系统时间将停滞并于恢复时跳转至指定时刻，导致“SHIME 系统时间”滞后于实际时间。当 SHIME 系统时间达到午夜时，会自动校准至实际时间。因此必须避免午夜后短时间内安排操作，若暂停时间过长（如 2 小时），可能导致午夜后前两小时内的操作指令丢失。

如何计算泵速？

当执行非标准 SHIME 实验（例如多 SHIME）时，应重新计算营养培养基和胰液的泵速，以便它们分别在 30 分钟或 15 分钟的间隔内输送所需量的液体。泵速应始终在 3.5 至 10mL/mL(上排 30rpm)之间,3.0 至 4.0 mL/min(下排 12rpm)：

- 若计算所得泵速较低，则应在更短的时间间隔内完成输注
- 若计算所得泵速较高，则需通过多个泵（或稍长的时间间隔）完成输注

若需经同一胃/小肠腔室向四个近端结肠血管单元供液，则该腔室应接收 560 mL 营养液（即  $140\text{ mL} \times 4$ ）及 240 mL 胰液（即  $60\text{ mL} \times 4$ ）。根据相应时间间隔（分别为 30 分钟和 15 分钟）计算，所需泵速分别为 18.67 mL/min 和 16 mL/min。因此，营养液需由两台泵以 9.33 mL/min 的速率输送，胰液需由两台泵以 8 mL/min 的速率输送。

注意：

- 如下文所述，特定肠道区域的平均水力停留时间并不取决于泵速与时间间隔，而仅取决于传输体积及各腔室内的液体体积。
- 结肠腔室的液体输入与输出始终以 3.5 mL/min 的速率进行。。

以下示例展示了常规成人 SHIME 系统操作参数的计算方法：

	Volume (mL)	pump speed (mL/min)	Exact time interval (min)	time interval (min&sec)	rounded *3	Start time within each 8h cycle (h&min)	End time within each 8h cycle (h&min)
pepsin	28	3,5	8,00	8'	8'	0'	8'
feed	112	3,73	30,00	30'	30'	0'	30'
pancreatic juice	60	4	15,00	15'	15'	1h30	1h45'
ST/SI	140	3,5	40,00	40'	60' *1	1h30	2h30'
SI/AC	200	3,5	57,14	57'08"	75' *2	3h	4h15'
AC/TC	200	3,5	57,14	57'08"	75' *2	3h	4h15'
TC/DC	200	3,5	57,14	57'08"	75' *2	3h	4h15'
DC/W	200	3,5	57,14	57'08"	75' *2	3h	4h15'

注：

黄色单元格是计算泵进给量/泵需要工作的确切时间间隔的决定因素

1 对于营养素/酶的给药，时间应该精确地计算出在 ST/SI 之间转移特定量的时间。时间应该四舍五入，因为气体应该首先从管中取出，然后转移液体，直到所有剩余的液体都从管中排出

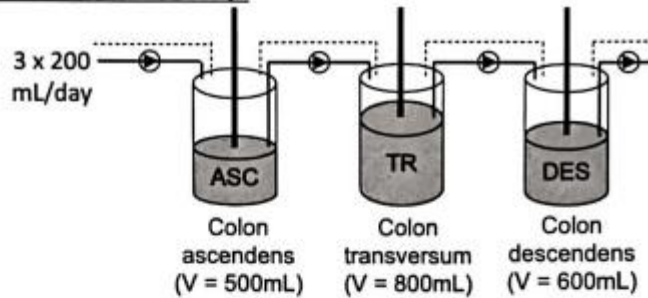
2 为了在结肠区域之间转移，如上所述，应该四舍五入时间以从管中排出气体，但也因为存在延迟，泵最初不会转移液体，因为来自前一个血管的液体仍需进入

3 圆整后的时间间隔应尽可能缩短，仅需满足液体在不同区域间转移所需的最短时长，并避免容器/管路中残留液体。因此，实验人员可预估各时间间隔的圆整范围，但在实验首日需对管路和容器进行检查，必要时延长相应时间间隔

注意：通过尽可能缩短间隔时间，(1)可避免泵运行时间过长，从而从系统中抽出气体而非液体，导致反应器内形成负压（此情况应予以避免，因其会增加出现微小泄漏时空气侵入的风险）；(2)另一优势在于，当泵仅按需运行时，可立即发现其工作异常（若运行时间过长，此问题将难以察觉）

平均水力停留时间的计算可按如下方法进行。该计算不依赖于具体的泵速或时间间隔长度，仅取决于各容器的总流入量和总体积。以下特定示例以常规成人 SHIME 系统为例：

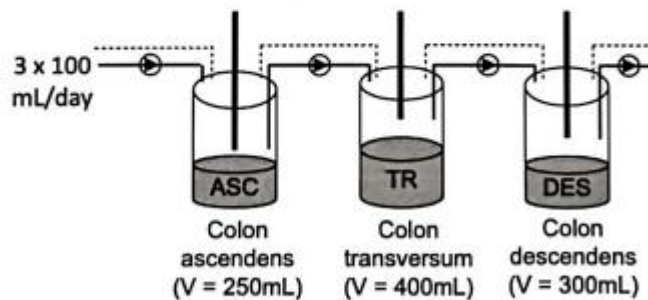
**Conventional adult SHIME setup:**



Average hydraulic retention times (based on influx and fixed volumes in each compartment):

- Colon ascendens =  $500\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 20\text{h}$
- Colon transversum =  $800\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 32\text{h}$
- Colon descendens =  $600\text{mL} / (600\text{mL}/24\text{h}) = 24\text{h}$

**If volumes are downscaled in the same adult SHIME setup:**

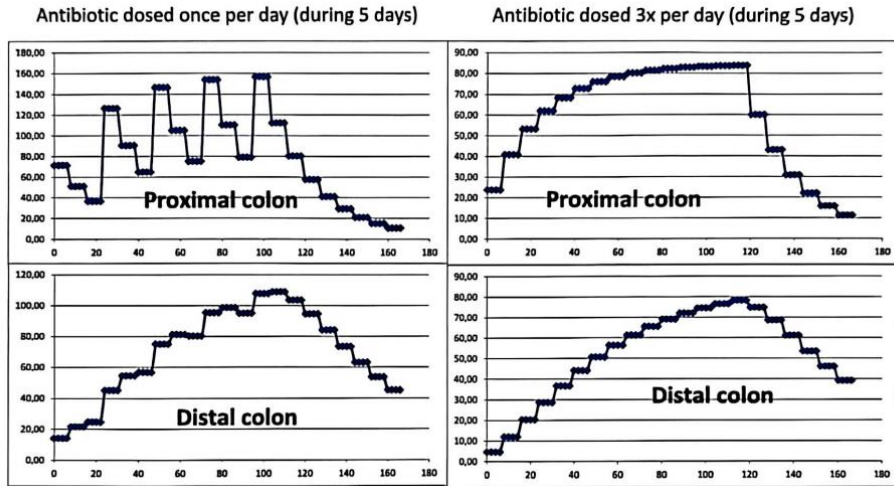


Average hydraulic retention times should be the same:

- Colon ascendens =  $250\text{mL} / (300\text{mL}/24\text{h}) = 20\text{h}$
- Colon transversum =  $400\text{mL} / (300\text{mL}/24\text{h}) = 32\text{h}$
- Colon descendens =  $300\text{mL} / (300\text{mL}/24\text{h}) = 24\text{h}$

## 2.2 产品水平计算

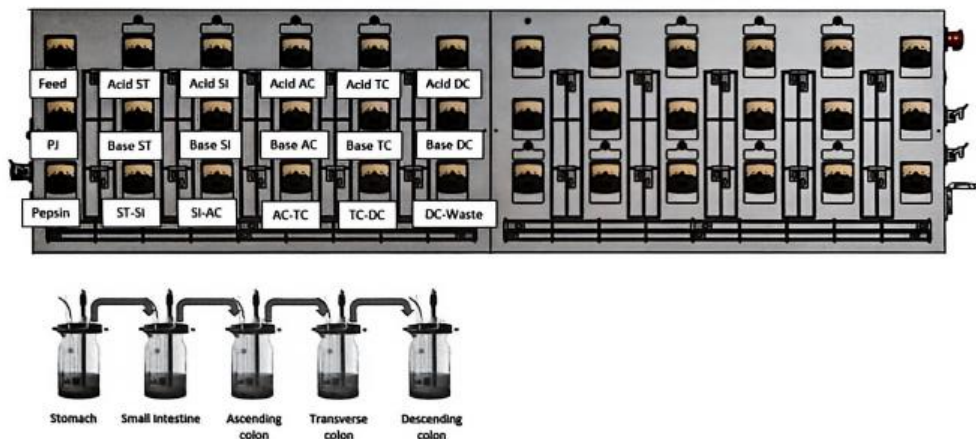
基于液体转移速率和各腔室的容积，可通过计算对处理后的产物浓度进行理论估算。例如，该方法可用于说明：与每日一次给药相比，每日三次给药时抗生素浓度更为稳定；或表明抗生素在远端结肠中积累所需时间更长，且从该区域清除所需时间也较长。详细计算可根据需求提供。



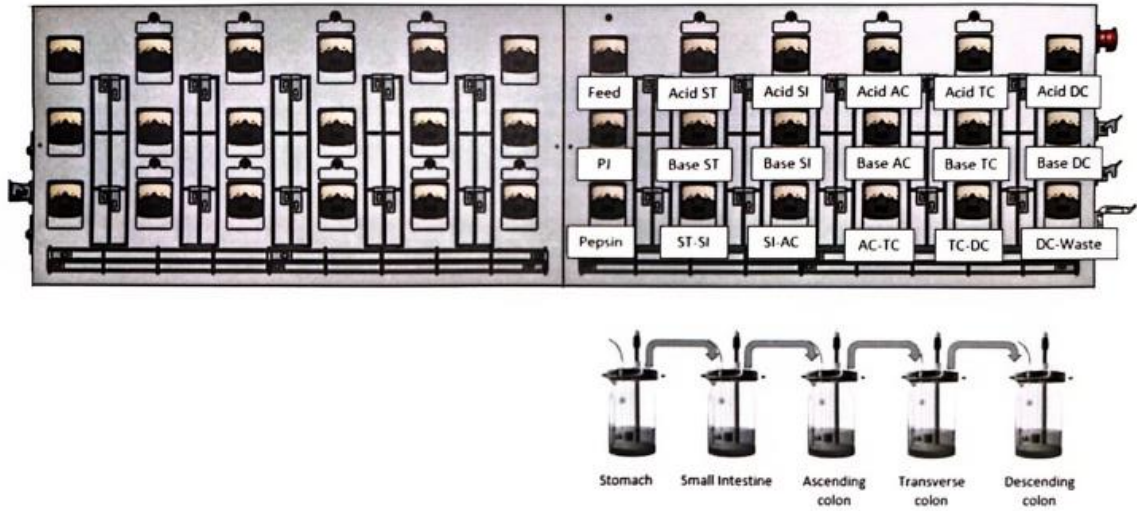
## 2.3 泵配置与反应容器布局

SHIME 技术平台具备根据实验室具体条件优化泵配置与反应容器布局的能力。冰箱、加热器或酸碱试剂盒的位置可能成为实验配置决策中的影响因素。通过此类优化，可实现对每个实验装置的个性化调整，从而减少管路耗材的总使用量。

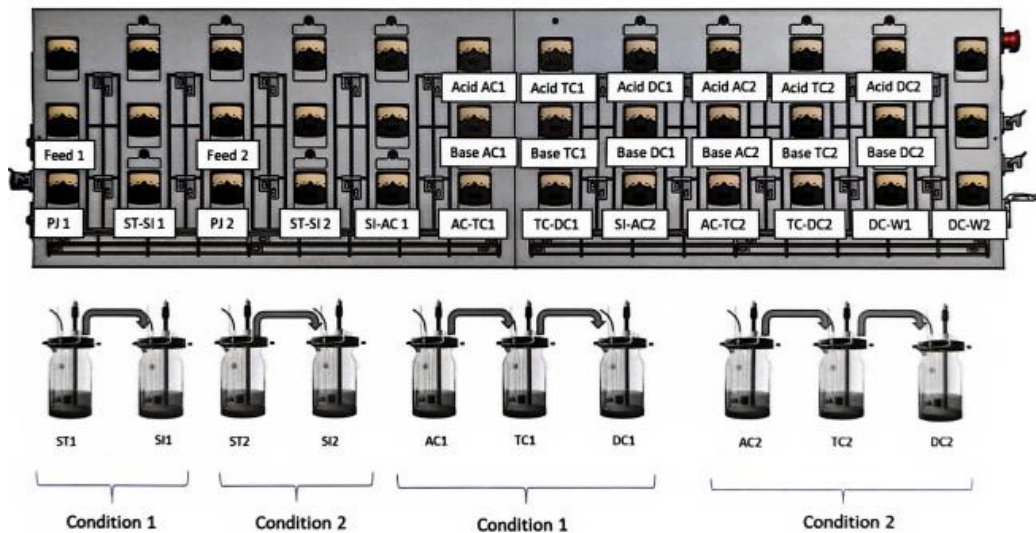
- 单套 SHIME 系统配置（若无需模拟胃/小肠段 pH 调控或胃蛋白酶添加功能，可省略相应泵单元）
- 操作台左侧工作模式：



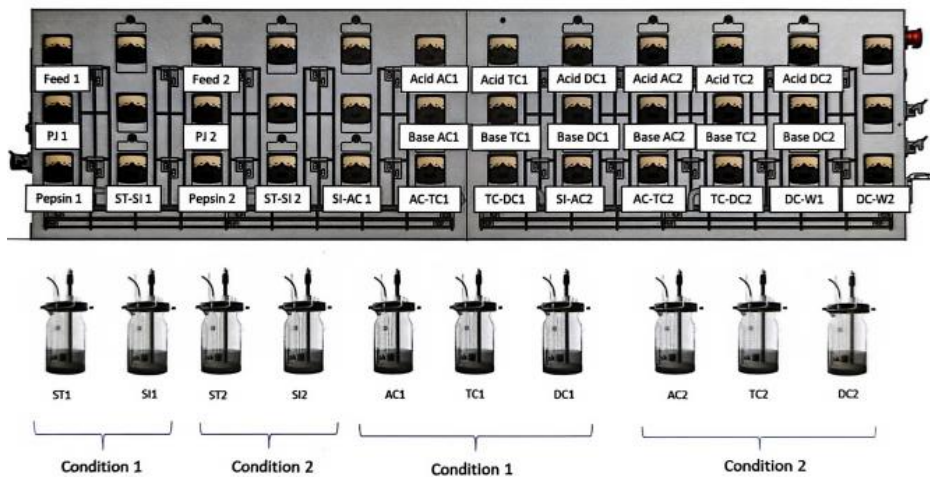
➤ 操作柜右侧工作模式：



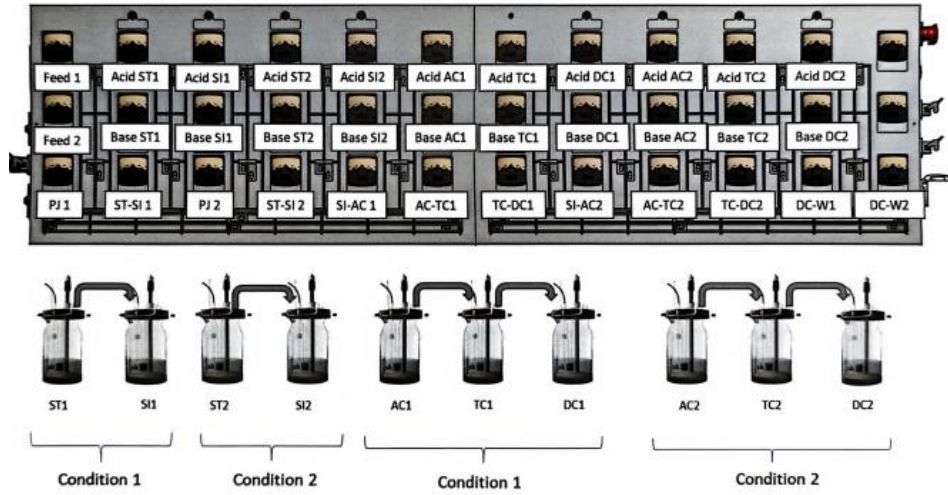
➤ TWIN SHIME 1：仅结肠 pH 控制，未添加胃蛋白酶



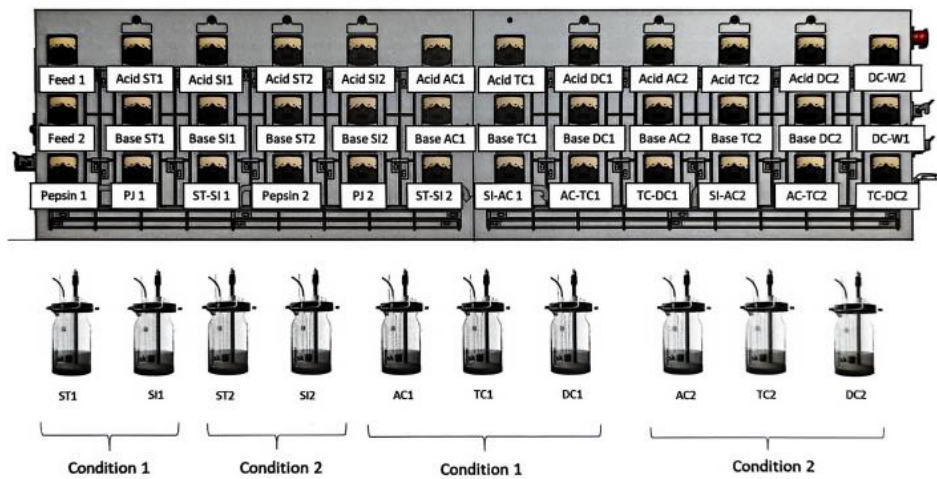
➤ TWIN SHIME 2：仅结肠 pH 控制，添加胃蛋白酶



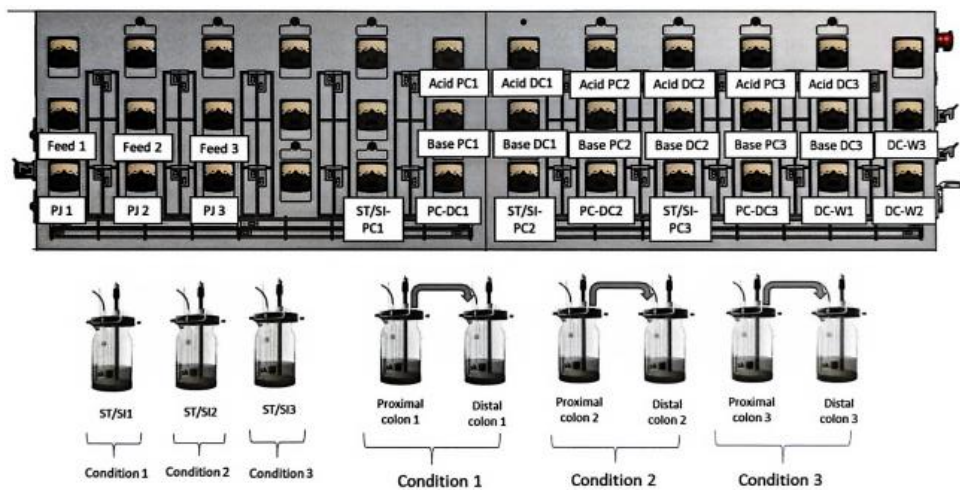
- TWIN SHIME 3: 全部反应器 pH 控制, 未添加胃蛋白酶



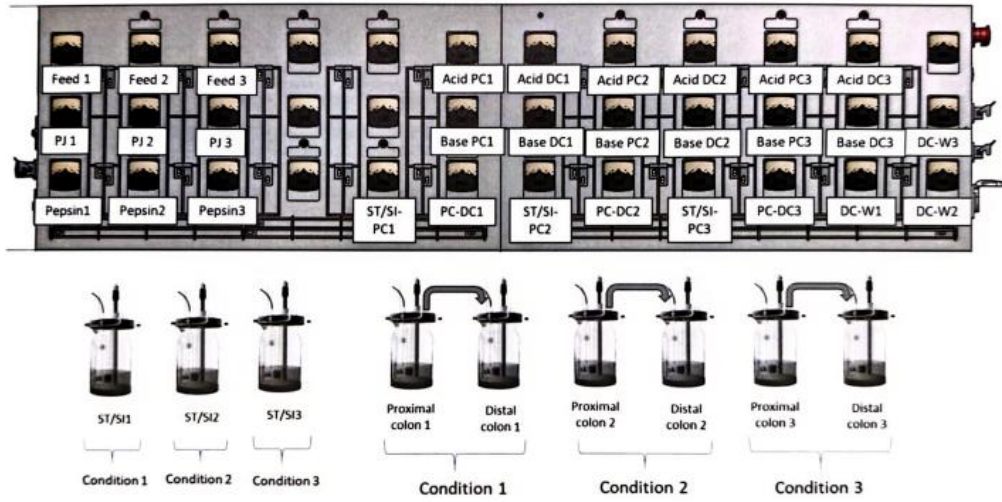
- TWIN SHIME 4: 全部反应器 pH 控制, 添加胃蛋白酶



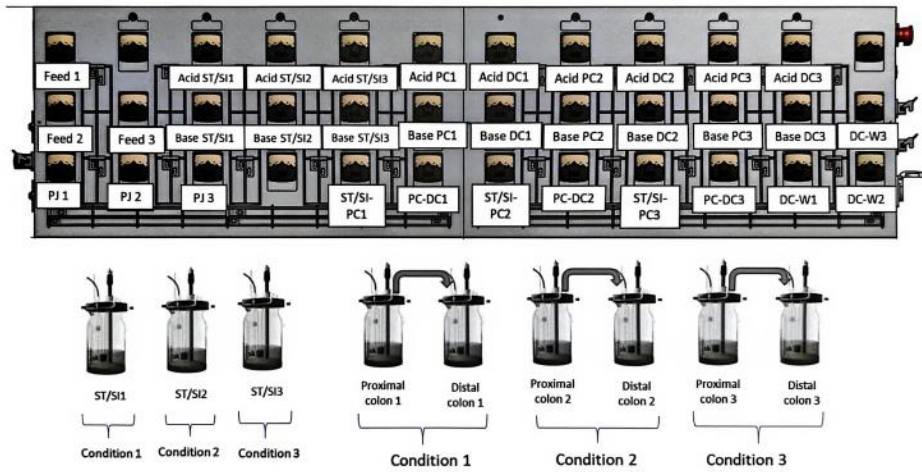
- Triple SHIME 1: 仅结肠 pH 控制, 未添加胃蛋白酶



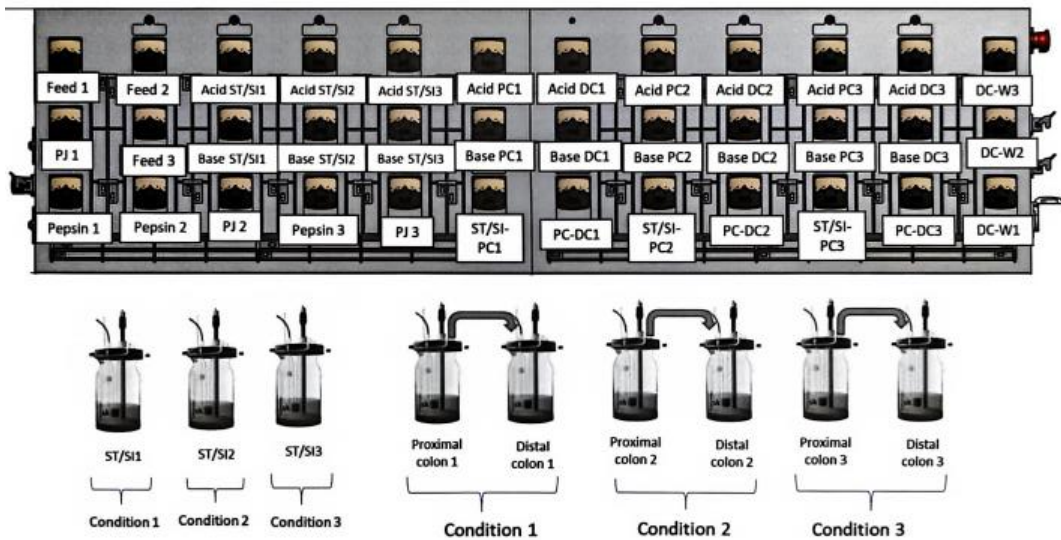
- Triple SHIME 2: 仅结肠 pH 控制, 添加胃蛋白酶



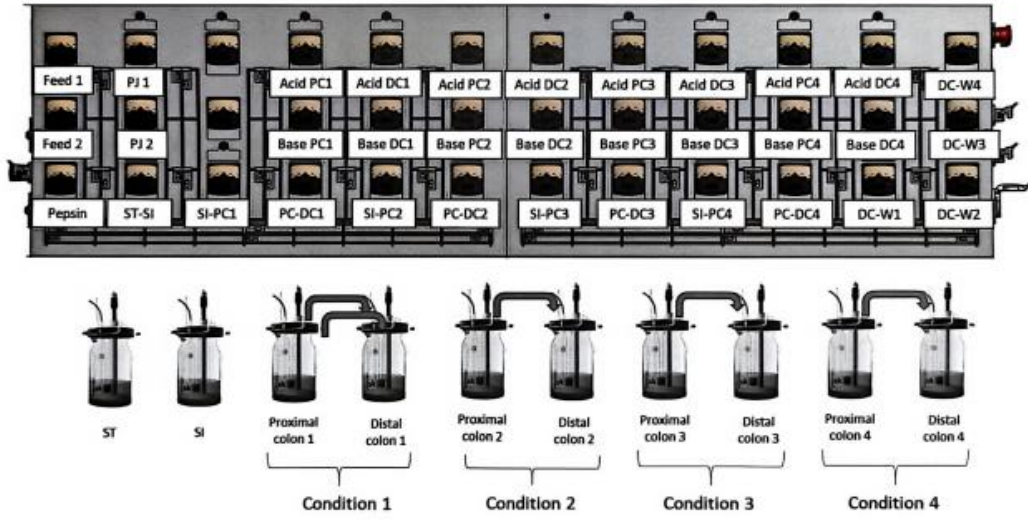
- Triple SHIME 3: 全部反应器 pH 控制, 未添加胃蛋白酶



- Triple SHIME 4: 全部反应器 pH 控制, 添加胃蛋白酶



➤ Multi SHIME: 四个平行远端结肠单元



### 3 SHIME®实验的运行

在构建 SHIME 之前，准确了解您的设置非常重要。有关泵配置和容器定位的建议，请参阅第 2.3 节。机柜附带的质量控制文件中包含启动指南。

#### 3.1 构建一个 SHIME 实验系统

- 在实验柜上标明各泵及 pH 探头接口的对应名称。
- 为各容器标注相应名称。
- 将管路连接件安装至泵用软管上。
- 打开所有待使用的泵，并插入由 ProDigest 提供的黄色泵用软管。将泵完全打开，以便轻松装入软管。这确保所有泵的软管安装方式一致。此外，必须使用该特定型号的黄色软管，因其能够耐受泵体对软管的挤压操作，从而确保泵工作时液体正常输送，或泵停止时避免液体转移。若使用普通硅胶软管，对于不常运行的泵（如特定肠段的酸/碱泵），其软管可能粘连，导致泵重新启动时无法再进行液体输送。



- 在校准泵之前，需使管路弹性适度增加。可通过高速运转过夜（预灌注）实现该处理。此操作可确保泵在长期运行中保持功能稳定。若未进行该初始化处理，泵在校准数日后即会出现液体转移量下降的现象。因此，

每次更换管路后必须执行过夜预灌注程序。具体操作如下：进入“项目编辑器”→选择“预灌注”项→勾选全部 36 个泵位。完成预灌注后，需静置泵体 2 小时使其冷却至室温。

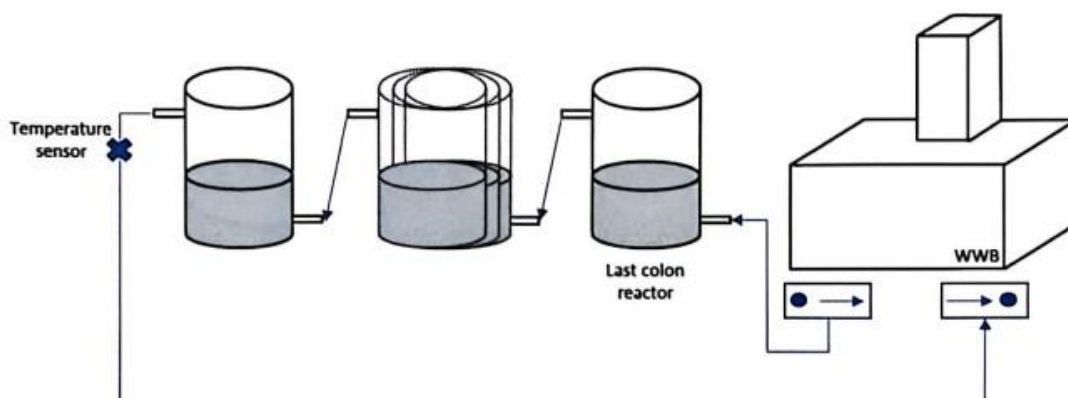
- 将水浴槽置于实验台面，建议靠近结肠双套罐的进水口一侧。  
注：水流路径为从水浴槽流向末位结肠罐的底部接口，再经首位胃罐的上部接口返回水浴槽。
- 将搅拌器置于实验台上。  
注：搅拌器应位于输送液体进出该容器的泵之间（关于泵与容器的最佳布局，请参阅第 2.3 节示意图）。此外，用于向特定肠道区域添加酸和碱的泵应直接位于该区域上方，此举可减少所需管路长度。
- 将用于饲料和胰液（PJ）的搅拌器置于冰箱中。冰箱应安装在实验台下方，并与营养培养基/胰液泵的位置对应。
- 将双层夹套玻璃反应器放置于搅拌器上方。左侧起始位置放置较小反应器（用于胃和小肠），随后为较大反应器（用于结肠）。每个容器均设有进口和出口，用于连接来自温水循环器、流经容器夹套外壁的循环水。



- 将带有白色倒刺接头的红色连接件拧紧于玻璃反应器上，用于连接暖水循环系统的管路。



- 首先，使用 WWB 管路将第一容器与温水循环器的出口相连。首个接收温水的容器位于装置右侧（即结肠反应器所在侧）。因此，建议将温水循环器也置于装置右侧，以减少温水进入首个反应器前的热量损失。温水将通过下部接口进入各容器，并通过上部接口排出。该设计可确保气泡形成时自动从外壁排出，从而维持仅存水体的状态，以实现最佳的温度控制效果。



- 其次，使用 WWB 导管将外部玻璃反应器与温水循环装置连接起来。
- 反应器之间需相互连接。需注意，反应器之间的连接导管既不宜过短也不宜过长，最佳长度为 30 厘米，安装方式应如下图所示。

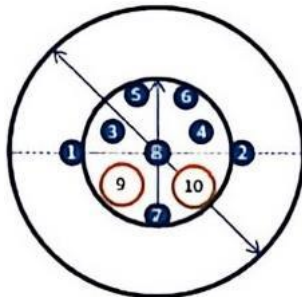


- 开启恒温水浴。向每个玻璃反应器中加入一枚磁力搅拌子。为确保不同结肠区段实验结果的可重复性，所有搅拌子必须具有完全相同的尺寸。较大体积的磁力搅拌子可用于搅拌冰箱中盛装食糜/胰液的较大容量瓶。



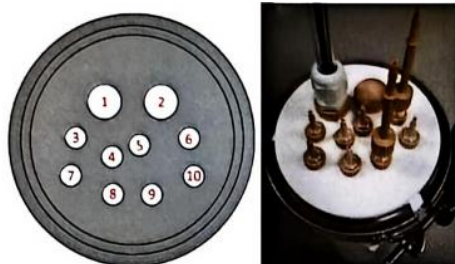
- 按如下方式组装每个反应器盖:

若使用第一代反应器盖:



Lid position	Fitting type	Stomach (ST)	Small Intestine (SI)	Ascending Colon	Transverse Colon	Descending colon
1	Addition pipe	Gas in	Gas in	Gas in	Gas in	Gas in
2	Addition pipe	Gas out	Gas out	Gas out	Gas out	Gas out
3	Addition pipe	(Pepsin)	Pancreatic juice	Sampling gas/free	Sampling gas/free	Sampling gas/free
4	Sampling tube	To SI	To AC	To TC	To DC	To Waste
5	Addition pipe	(Acid)	(Acid)	Acid	Acid	Acid
6	Addition pipe	(Base)	(Base)	Base	Base	Base
7	Sampling tube	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling
8	Addition pipe	Feed	From ST	From SI	From TC	From DC
9	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper
10	pH fitting	pH electrode	pH electrode	pH electrode	pH electrode	pH electrode

若使用第二代反应器盖:



Lid position	Fitting type	Stomach (ST)	Small Intestine (SI)	Ascending Colon	Transverse Colon	Descending colon
1	pH fitting	pH electrode	pH electrode	pH electrode	pH electrode	pH electrode
2	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper	Blind stopper
3	Addition pipe	Feed	From ST	From SI	From TC	From DC
4	Addition pipe	(Acid)	(Acid)	Acid	Acid	Acid
5	Addition pipe	(Base)	(Base)	Base	Base	Base
6	Sampling tube	To SI	To AC	To TC	To DC	To Waste
7	Addition pipe	Gas in	Gas in	Gas in	Gas in	Gas in
8	Addition pipe	(Pepsin)	Pancreatic juice	Sampling gas/free	Sampling gas/free	Sampling gas/free
9	Sampling tube	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling	Liquid sampling
10	Addition pipe	Gas out	Gas out	Gas out	Gas out	Gas out

- 将大号 O 型圈置于反应釜凹槽中，盖上釜盖，安装反应釜夹具。  
注意：确保反应釜与釜盖间的橡胶密封圈完全嵌入预留槽口，且釜盖严格对准玻璃反应器中心位置，随后牢固安装金属夹具。夹具应仅能通过手动方式勉强开合。

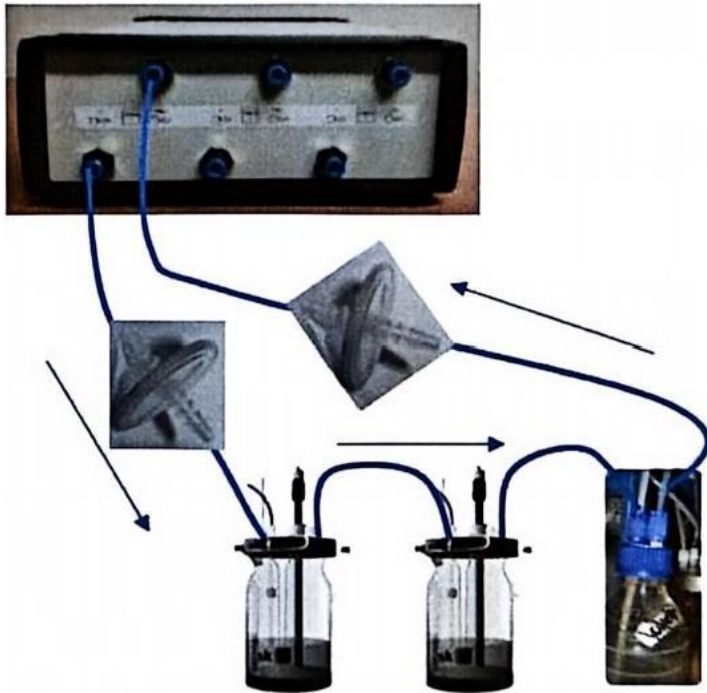
- 使用硅胶管连接冲洗系统。

通常，胃和小肠血管需与结肠血管分开冲洗，因其可能含有微量氧气，这些氧气来源于需氧营养介质的进入。应尽可能根据不同条件进行分离（取决于可用 N2DU 的数量），以防止不同条件间的微生物交叉污染。

若单个冲洗链中包含多个反应器，首台反应器的排气口可连接至下一台反应器的进气口。

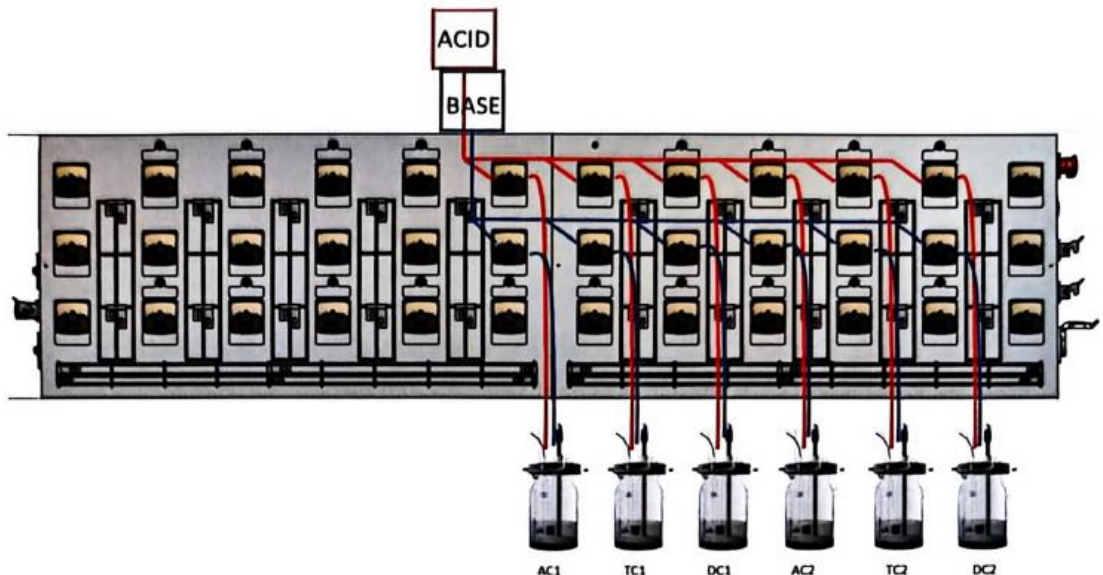
在冲洗系统出口处使用 500 mL 或 1 L 带专用盖的 Schott 瓶收集冷凝液（长导管不得接触瓶底）。应在冲洗单元的进气口/排气口处安装通

风过滤器（注意气流通过通风过滤器的方向）。



注意：为确定每个 SHIME 单元所需的冲洗时间，请查阅质量控制文件中的 SHIME 3-F7（"冲洗设置"）Excel 工作表。

- 使用 TPE 管路连接酸性和碱性管路系统，该连接可通过 Y 型接头以不对称方式完成。在此阶段，需使用装有蒸馏水的容器（用于校准目的）。



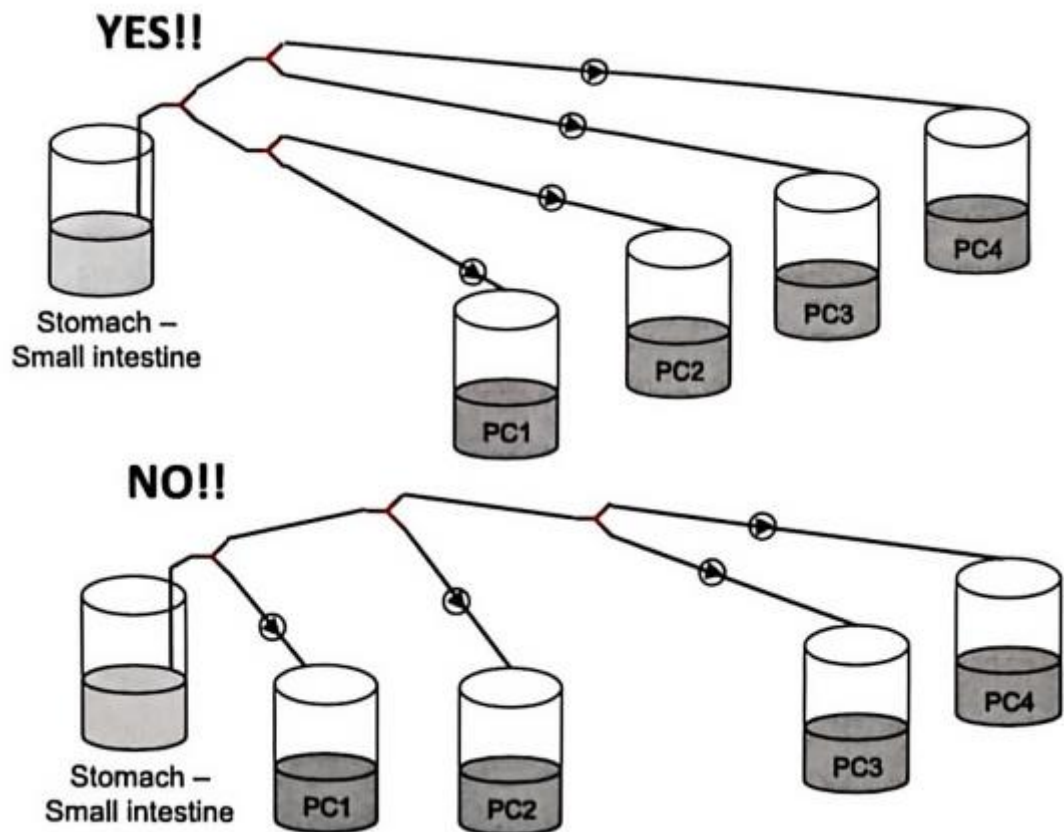
- 在容器底部（或最低液位处）设置排液管（采样管）。
- 将液体输送管路连接至 SHIME 系统：  
根据具体实验设置，泵的配置会有所不同（参见第 2.3 节）。所有用于液

体输送的泵均从左向右转动，以实现液体传输。

- Fridge -> stomach (feed)
  - Fridge -> small intestine (pancreatic juice)
  - Small intestine -> first colon region
  - Between consecutive colon regions
  - From last colon region to waste
- TPE tubing
- Silicon tubing

在进行这些连接时，应尽量缩短管路长度，同时充分利用垂直与水平支撑结构，以确保整体布局规整有序。对于胃与小肠的连接，需采用专用管路。

注：若使用单一小肠容器向多个结肠区域供液（MULTISHIME 系统），应确保从小肠隔室引出的硅胶管路分流方式在各容器间保持高度一致。每个连接点都会增加液体传输的阻力。这些差异通常可通过泵的校准消除，但为提高不同单元间的重现性，建议参照下图方案中第一个示例的配置方式进行预先优化。

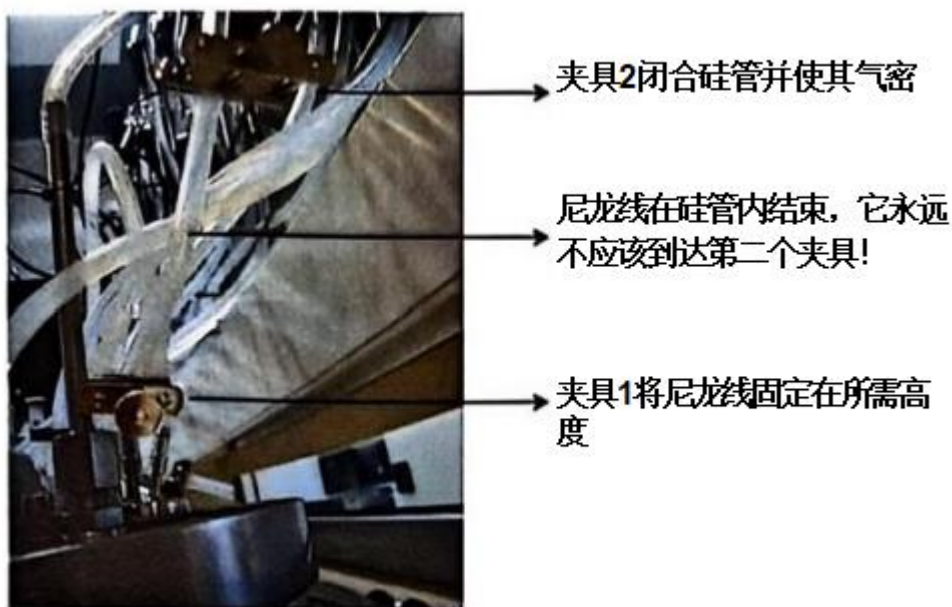


- 检查 pH 电极性能，并将结果记录于质控文件中的 SHIME 3-F10 表格（“pH 电极性能记录表”）。

重要提示：后续步骤（直至连接饲料与胰液）必须在同一天内完成！

- 向结肠反应器中加入蒸馏水（体积根据实验需求确定）。应通过称重方式精确计量水量，并将数据记录于质控文件的“快速启动指南”中。  
注：若使用磁珠，需额外补充水量以补偿磁珠所占体积。参考比例为每 30 颗磁珠对应 16 mL 水。
- 开启搅拌器（300 rpm），仅需按下启动按钮即可激活搅拌功能。
- 将 pH 电极置于反应器内。
- 使用胶带标记 pH 电极放置高度，并标注对应反应器名称。
- 若为 M-SHIME 系统：需向反应器中放置一个空袋。

为避免操作 M-SHIME 系统时氧气侵入，可采用以下方式固定包被黏蛋白载体的袋体：如图所示，第一个夹具用于固定连接袋体的金属线并维持其处于特定高度，第二个夹具则用于夹闭硅胶管并确保连接处气密性。需特别注意金属线应仅存在于第一个夹具处，不得伸入第二个夹具内部，否则可能导致气体渗入。



- 将液体输出管设置于正确高度（关键步骤）。该高度的确定方法如下：将采样管置入水中，缓慢向上提拉直至其恰好脱离水面。由于毛细管作用，管的最终位置应位于水面上方（+/-）3 mm 处。  
此步骤至关重要，因该操作确保各反应器中液体体积的精确施加。因此，操作时需确保搅拌器已启动。

注：ST/SI 系统的特殊要求：液体输出管不得触及反应器底部（保留 1

mm 间距), 以避免形成真空。亦可截取一段硅胶管 (切口需平整), 连接于液体输出管末端, 从而防止真空产生。

- 向结肠反应器中加入一定量称重的水 (20–30 mL), 通过泵出方式收集多余液体。计算结肠反应器内的实际容积 (下部空间)。允许与实际理论值存在 3% 的误差。若不符合要求, 需重新调整液体输出管高度并再次测试。将结果记录于 QC 文件的“启动指南”选项卡中。
- 使用胶带标记液体输出管的放置高度。此举既可防止管路滑落至正确高度以下, 也可在位置发生向上偏移时便于重新校准。
- 将 pH 电极从 SHIME 反应器中取出, 并置于存储液中 (不使用时, 建议尽可能长时间将电极保存在校准液 (3 M KCl) 中)。
- 将饲料泵和 PJ 泵连接至冰箱中的瓶子, 操作时需使用 TPE 管路 (并配合该管路使用 3.2–3.2 mm 接头)。

注:

(1) 选用容量适宜的储液瓶 (即总容量需足以维持整个周末的实验运行)。

(2) 饲喂液与胰液储液瓶需配备专用瓶盖。

(3) 泵体与储液瓶之间采用直连方式连接, 管路应尽可能缩短。

(4) 在饲喂液与胰液接口最近处设置三通连接器, 其开放端用短管段和夹钳封闭。该设计便于实验过程中对饲喂液/胰液流速进行监测。

- 在取样端口安装带取样阀及安全压紧夹钳的短管段 (长度 16 厘米)。



- 编写 SHIME 实验的软件程序 (参见软件手册第 4 章)。
- 按照第 4.4 节和第 4.5 节所述方案配制培养基与胰液。
- 若为 M-SHIME 实验: 制备黏蛋白包被载体及外部袋装系统 (参见第 4.7 节) 泵校准 (需记录于质量控制文件中):

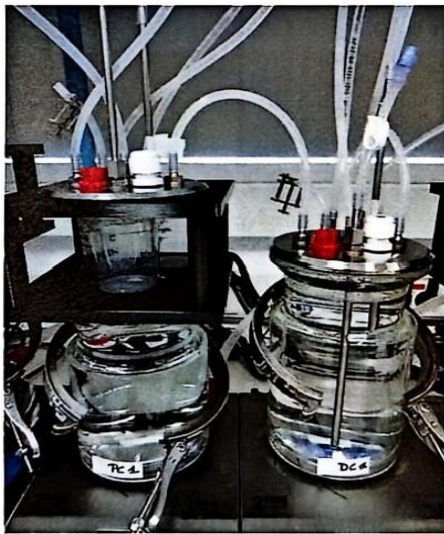
完成系统搭建后，使用蒸馏水进行泵校准。不同泵之间的正常变异率仅为 3%。校准可消除泵间差异。可能导致泵间差异的因素包括：泵输送液体时存在高度差：例如某泵需从低于泵体 2 米的冰箱中吸取液体，而另一泵从低于泵体 30 厘米的 SHIME 容器中吸取液体→在相同流速下，高度差越小，泵输送液体的效率越高；泵前管路中连接件的数量差异：连接件越多，液体输送效率可能越低。

此类差异可通过校准消除。具体校准步骤详见软件操作手册（第 7.2 节）。校准应在泵最大转速的 30%至 80%范围内进行。在 30%至 100%转速区间内，泵体工作呈现完美的线性特征（ $R^2=99.9\%$ ）。

因此，最重要的一点是，必须在与 SHIME 实验相同的装置中对泵进行校准。这意味着需要先构建 SHIME 系统，随后使用重水（ $d-H_2O$ ）进行泵的校准。此时，SHIME 反应器中将注入重水，并连接一瓶重水以替代饲料/胰液。

注：如需精确测定酸/碱消耗量，则这些泵也应在实验前完成校准；否则，仅需对负责 SHIME 反应器液体进出传输的泵进行校准即可。

为简化校准流程，可使用校准支架。该支架可同时固定多个收集杯，降低液体溅出风险。使用时，先将带接头的上盖抬起，将支架置于其下方，使上盖稳妥置于支架上部，而接头则嵌入支架下部的插槽中。收集杯应放置于支架底部（见下图）。



由于液体输出管不再完全浸入水中，因此无法通过抽吸将水输送至下一反应器，故无法对所有泵进行同步校准。这意味着灌注控制器（PC）与

排水控制器（DC）需分阶段分别进行校准。

移除并将比色杯置于适配器下方时需谨慎操作，因适配器可能残留多余重水滴，导致读数准确性下降。若管路仍附着较大水珠，应尽量将其收集至烧杯中。

- 清空容器并彻底干燥。
- 使用外部温度探头验证温水循环器温度，如配备温度传感器则需进行校准。

### 3.2 实验启动

- 校准 pH 电极。通过专用电缆，可将电极连接至 SHIME 控制柜上的接口。连接后，即可按照软件操作手册（第 7.1 节）进行校准。需使用室温下的新鲜校准液（pH=4 和 pH=7），先以 pH=7 标准液校准，再以 pH=4 标准液校准。为避免电极间误差，应确保所有电极均使用同一批校准液进行校准。

关于电极高压灭菌的注意事项：

若对电极进行高压灭菌，务必检查电极与保护帽之间是否装有橡胶密封圈。当保护帽旋紧于电缆接口时，电极可进行高压灭菌（平均可耐受 10 次灭菌循环）。

- 连接酸液与碱液箱。操作时需佩戴防护眼镜。  
注：确保酸液与碱液箱处于满液状态，若未满请及时补充。
- 预先灌注酸/碱液输送管，使液体充满至管口接触瓶盖处，以避免酸/碱泵首次启动时氧气进入系统。
- 将酸化后的营养培养基、胰液（必要时包括胃蛋白酶）置于冰箱中冷藏，并预先灌注硅胶管以避免胃腔室泵首次启动时氧气进入。

营养培养基/胰液/胃蛋白酶瓶可配备蓝色“专用瓶盖”（如右图所示）。

灭菌时，瓶内放置磁力搅拌子并旋紧蓝色瓶盖。该瓶盖设计使一根管路穿透瓶盖从瓶底吸取液体，另一根管路仅固定于瓶盖处用于空气进入（通过 0.2 $\mu$ m 过滤器）。相同原理可应用于废液瓶：为防止气溶胶进入实验室，废液瓶排气口可与 SHIME 操作柜气体排放口连接至同一排

气系统。



- 若需进行备份，请安装程序备份（进入“系统配置”→“备份路径”→选择正确的文件夹）。

- 向容器中灌注非酸化饲料。

注：（1）务必充分混匀饲料（应确保均匀性！），尤其是淀粉与黏蛋白易发生沉淀，若添加前未充分混匀，可能导致重复样本间出现显著差异。

（2）同一重复组容器应使用同一瓶饲料。

- 对于 M-SHIME 系统，需添加黏蛋白包被的载体。
- 使用金属夹具密闭反应器。
- 进行气密性检查：

开启冲洗装置，并封闭首级容器的气体出口（即气体输入口）。监测仪显示的气体流量应立即从初始值（如 5 L/min）降至 0 L/min。若流量下降缓慢，表明容器盖体存在泄漏。在连接处周围滴加去离子水（禁用泄漏检测喷雾，以免泄漏时试剂进入反应器），若有泄漏，连接处将产生气泡。此时应适当拧紧泄漏处的连接件。若拧紧后泄漏仍未

解决，应检查橡胶密封圈，必要时予以更换。避免过度拧紧金属部件与聚碳酸酯接口，以免损坏聚碳酸酯材料。

注意事项：

由于在 ProDigest 实验设施中构建模型时需对气体流量计进行特定程序校准，软件界面显示的 0 mL/min 可能实际对应 0.1 mL/min。为确认软件中何值对应真实零流量，可在管路接入 SHIME 系统前闭合管道。

需特别注意盲塞接头、pH 电极连接器的密封性，以及反应釜盖与容器间的气密性。确保橡胶密封圈完全嵌入预设凹槽至关重要。若釜盖与容器间存在气密性问题，通常可通过以下现象判断：（1）橡胶密封圈外侧出现水蒸气凝结；（2）密封圈沿周向未均匀压紧。

- 在接种物制备过程中，持续通气 10 分钟。
- 制备接种物（参照第 4.2 节）。
- 按反应器体积 5%的比例接种至 SHIME 系统。
- 继续通气 20 分钟。
- 启动接种程序。该程序包含对结肠区域进行连续 pH 控制的相关操作。  
注：在接种程序中需包含在最终程序启动前调整结肠反应器液位的操作（例如，若最终程序计划于 9:00 启动，则可在 6:00 至 8:00 期间以 3.5 mL/min 的速率将结肠反应器中的液体转移至废液收集装置）。该操作是必要的，因添加接种物及为维持适宜 pH 范围而加入酸/碱后，系统液位将升高。

非必需但建议执行：留存粪便悬浮液等分样本

直接保存：用于后续潜在的 DNA/短链脂肪酸（SCFA）等分析

添加冷冻保护剂保存：用于后续潜在微生物培养，具体操作可遵循第 4.3 节方案。

### 3.3 接种后次日

记录启动期间消耗的酸/碱量（各重复组应保持一致；软件手册第 3.7 节）。该数据可登记于质量控制（QC）文件中。

- 启动最终程序，其包含以下操作
  - 泵动作以输送饲料/胰液
  - 容器间液体输送的泵动作
  - 冲洗操作以确保 SHIME 容器中的厌氧环境（通常设定于采样后即刻进行）
  - 结肠区域的持续 pH 调控
- 采样（若需进行，参见第 4.1 节）应于固定时间点执行（例如 11:30，通常于小肠容器内容物传递至结肠前进行）。

### 3.4 实验中

- 于固定时间点（例如 11:30，通常恰在液体由小肠反应器转移至结肠反应器之前）进行采样（具体时间点参见第 4.1 节）
- 必要时配制 SHIME 营养培养基、胰液、胃蛋白酶、酸液、碱液及黏蛋白微球
- 每周更换 50%黏蛋白微球三次（参见第 4.7 节）

为保障实验质量，严格的质量控制至关重要!! 关于最佳质量控制措施的详细说明，请参阅独立的质量控制模板。下文将列举若干重要质控节点的描述。

在 SHIME 实验过程中需频繁检查的重要监控点包括：

- 确认 pH 值是否处于正确范围
- 磁力搅拌器需持续运转（结肠反应器及营养培养基中均需搅拌），以确保悬浮液均质化。若搅拌器工作异常，将导致 pH 测量失准，进而可能引发酸碱度剧烈波动，造成 SHIME 反应器内盐分过度累积
- 确保营养培养基与胰液储备充足（每单元每日消耗量为 420 mL 营养培养基与 180 mL 胰液）
- 核对各结肠反应器容积，并验证多组平行实验的小肠培养末端悬浮液体积是否一致
- 所有反应器应维持 37°C 恒温（循环暖水管路需保持通畅无弯折），定期监测恒温水浴槽的温度与水位。建议每周至少补充一次恒温水浴槽储

水，若注水过量需排出多余水量后重新启动循环系统

- 冲洗过程中应杜绝泄漏，发现泄漏需立即密封处理
- pH 控制器的导管应充分浸没于酸碱容器液面下，饲液/胰液输送管同样需确保完全浸没
- 保证酸碱容器内液量充足
- 废液收集容器需保留足够容量
- 黏液微球应始终处于液面以下

临时检查点（参见质量控制文件）

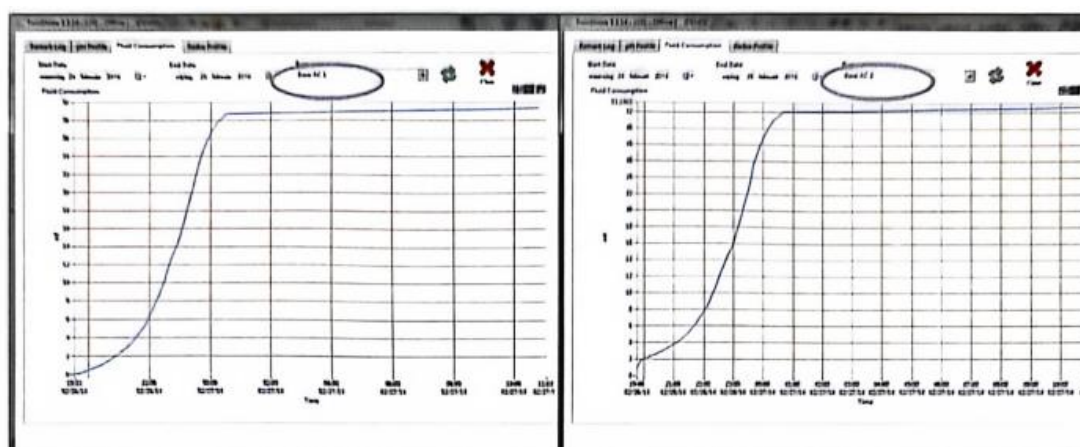
- 于稳定期结束时测定短链脂肪酸（SCFA）水平。若出现异常，可混合不同单元样本以确保结果可重复性
- 使用外部探针测定不同单元样本的 pH 值，以验证监测仪显示的 pH 是否准确
- 每周通过固定流速（程序中使用的流速）和固定时长（例如 5 分钟）泵送饲料和/或胰液（PJ），对饲料泵和胰液泵进行校准。可在管路中增设 Y 型连接器和夹具，将液体引流至反应器旁的烧杯中进行测量。若存在偏差（超过 3%），可按比例调整泵速。校准完成后，需松开通往反应器的管路夹具。
- 收集各 SHIME 单元的废液流。此举旨在验证转移至 PC/DC 单元的体积准确性，从而对传输泵进行校准。需确保精确转移 200 mL，并考虑单元内酸/碱消耗量。若存在偏差，可按比例调节泵速。注意：应在未采样的运行周期内收集废液流；若已采样，需对收集体积进行采样量校正
- 记录固定时间间隔内的酸/碱消耗量，以监测实验运行状态是否符合预期（参见软件手册第 3.7 节）

相同配置的单元应呈现相似的酸/碱消耗曲线。如下所示，我们以一份标准成人 TWIN-SHIME 项目报告为例（该实验未控制上消化道 pH 且未添加胃蛋白酶）进行说明。

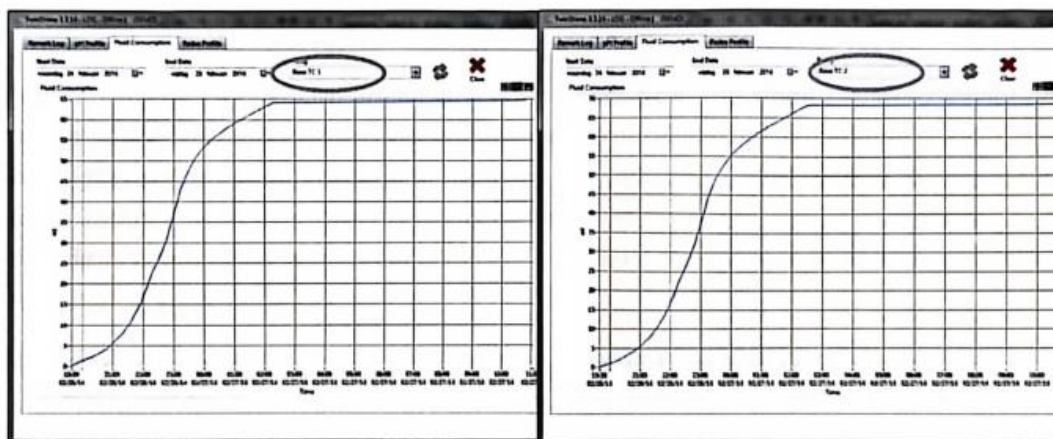
酸碱消耗报告（重要说明：下述实验采用缩小体积（减少 50%）的方案进行。若采用常规体积进行实验，酸碱消耗数据应与下述报告值的两倍进行比较。）

SHIME®系统的初始启动包括将粪便接种物在 SHIME 营养培养基中（5 mL 粪便浆液/100 mL 培养基）于不同结肠区域进行过夜孵育（16 小时）。在此过程中，粪便微生物接触到各结肠区域相应的体积与 pH 范围。碱液（0.5 M NaOH）的消耗量是评估 SHIME 模型中微生物整体发酵活性的一个重要指标。当营养培养基被输送至结肠区域后，细菌将产生短链脂肪酸（SCFA），需通过添加碱液以维持 pH 处于适宜区间（升结肠：5.6–5.9；横结肠：6.15–6.4；降结肠：6.6–6.9）。尤其在启动阶段，因营养培养基中不含 pH 缓冲剂（如自第 1 天起通过胰液提供的碳酸氢盐缓冲体系），微生物产 SCFA 过程将导致显著酸化。从启动期内 6 个碱消耗曲线可见，两个 SHIME 单元在各结肠区域中的持续时间和曲线形态均表现出良好的重复性。升结肠中底物完全发酵耗时约 5 小时（自 19:30 至次日 0:30）。而在横结肠与降结肠中，因筛选出更适应较高 pH 环境的微生物群落，其发酵活性较慢，初始发酵期延长至约 6.5 至 7 小时（自 19:30 至次日 2:00/2:30）。

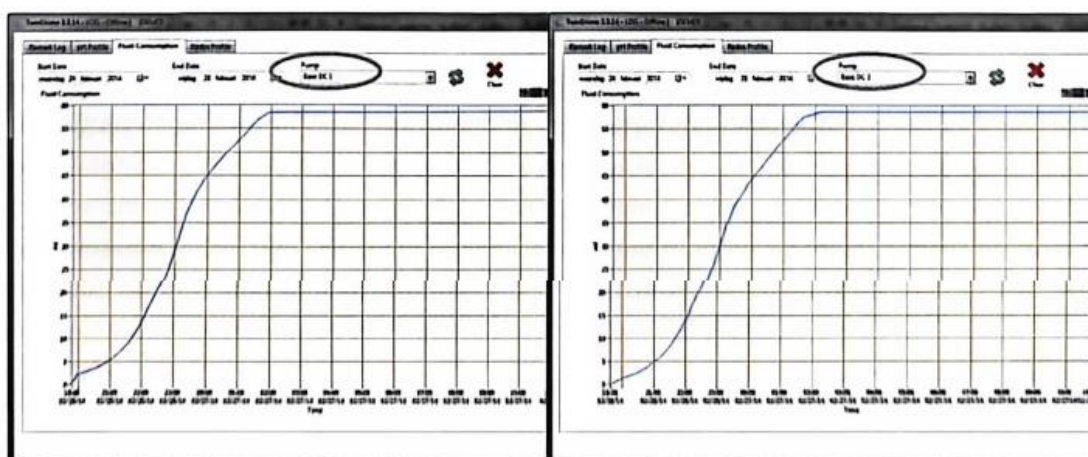
升结肠区域启动期间的碱液消耗量



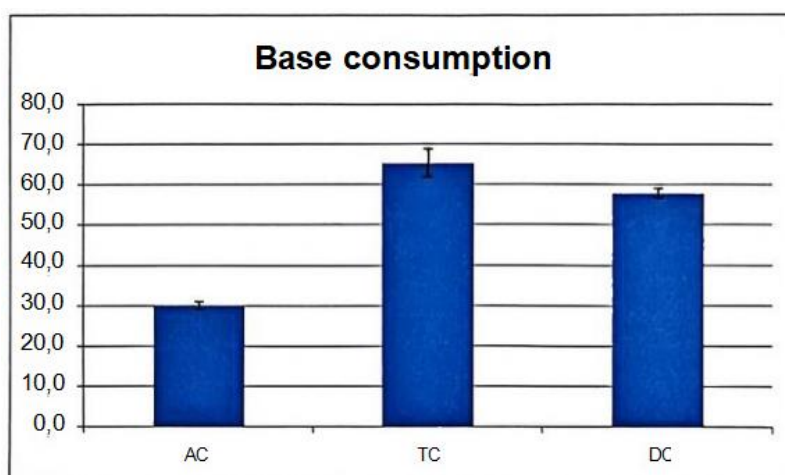
横结肠区域启动期间的碱液消耗量



降结肠区域启动期间的碱液消耗量



升结肠/横结肠/降结肠启动期间绝对碱液消耗量 (mL)



除了相似的发酵特征外，两个 SHIME 单元之间的绝对碱消耗量也具有高度可重复性，这一点从上图中较小的标准差可以看出。横结肠和降结肠区域的碱消耗量较高，是由于这些区域（分别为 400 mL 和 300 mL）相较于升结肠（仅 250 mL）具有更大的容积。此外，横结肠和降结肠需要维持较高的 pH 值，这也导致需要消耗更多的碱以维持较高 pH 水平。

经过一夜孵育后，启动了实际包含液体转移的程序。随后，TWINSHIME® 系统开始被喂食（每日 3 次）含有营养培养基和胃蛋白酶（胃部）以及胰液（小肠）的混合液。此后，悬浮液依次转移至不同结肠区段。下图展示了升结肠的碱消耗曲线，可清晰反映出微生物在预期的三个周期内均保持活性，即在每次补充新鲜营养培养基时（每日于 13:15、21:15 和 5:15 进行三次）均启动发酵过程。同样，在横结肠和降结肠中，两个单元间的碱消耗曲线也表现出高度一致性。后两个结肠区域的碱消耗还用于抵消因黏蛋白降解等过程引起的酸化作用。与升结肠相比，末两个结肠区域的大部分碱消耗还源于前一结肠区段较低 pH 悬浮液的流入（例如横结肠 pH 为 6.15–6.4，而其所接收的来自升结肠的悬浮液 pH 为 5.6–5.9）。

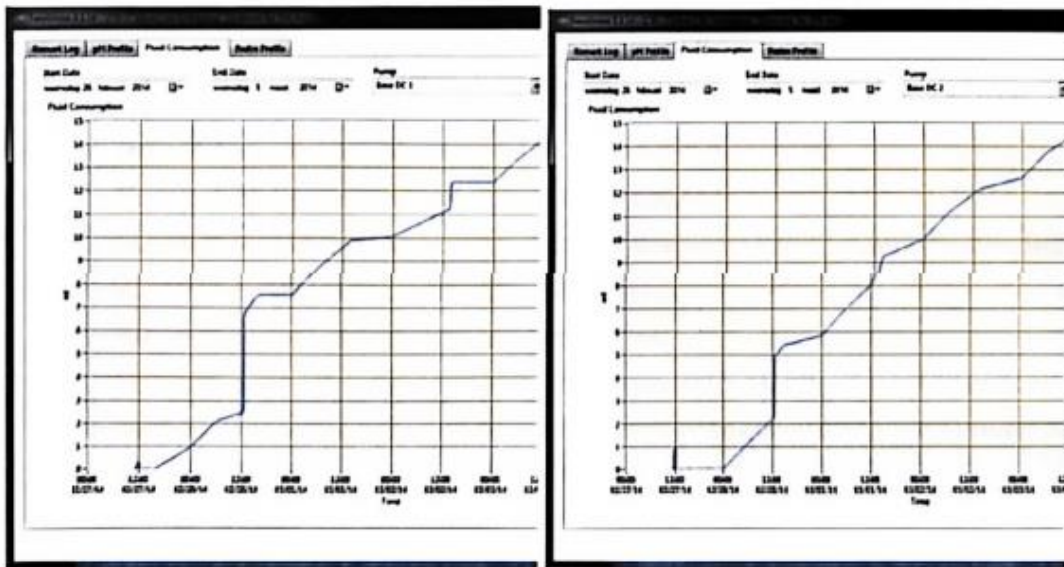
启动后升结肠碱消耗量



### 启动后横结肠碱消耗量



### 启动后降结肠碱消耗量



### 3.5 实验末期

- 操作过程中请佩戴安全眼镜和手套
- 停止 SHIME 系统运行程序
- 为避免管路压力过高导致酸/碱液泄漏，请先启动废液泵进行预灌注。  
此操作可通过出口处的废液容器和过滤器释放系统压力

- 关闭酸/碱溶液盒
- 打开泵头，将连接酸/碱溶液盒的管路断开，使系统中残留的液体排入反应器
- 关闭搅拌器
- 清空 SHIME 培养单元：在取样阀处安装带有倒钩适配器的鲁尔锁接头，连接硅胶管路至相应的废液容器。启动液体流动时，需开启相应单元的冲洗功能并夹闭该单元的"冲洗排出管"（注意：确保对应培养单元的所有泵头均已关闭，否则氮气将从未夹闭的管路逸出，无法启动液体流动）。液体开始流动后立即关闭冲洗功能，利用连通器原理通过不同水平面的液位差将废液收集至废液容器中
- 废液处理需遵循当地规范。以比利时为例：  
常规 SHIME 废液应收集于 SHIME 系统的专用废液容器中  
含抗生素废液必须使用密闭废液容器进行收集
- 清空废液容器  
常规废液可直接通过漏槽（sink）排放  
含抗生素且无法通过高压灭菌降解的废液，应按医疗废物流程处置
- 更换废液容器出口处的 0.2 微米 Whatman 过滤器，安装新过滤器
- 断开 pH 电极与 SHIME 控制柜之间的 BNC 接口，清除残留胶带，用 70%乙醇湿润的拭纸清洁接口。
- 为 SHIME 控制柜的 pH 电极接口安装防护帽
- 为 pH 电极顶端安装防护帽
- 从培养单元中取出 pH 电极
- 用蒸馏水冲洗电极去除可见污物
- 用 70%乙醇冲洗电极
- 用蒸馏水再次冲洗电极
- 仅在进行强污染基质长期实验（或 pH 性能显著下降）时，执行电极再生程序
- 将 pH 电极浸入 0.5 M 氢氧化钠溶液 10 分钟
- 用蒸馏水冲洗电极

- 将 pH 电极浸入 0.5 M 盐酸溶液 10 分钟
- 使用蒸馏水冲洗电极
- 将 pH 电极置于填充新鲜 3M KCl 溶液的清洁帽中
- 向各 SHIME 反应器补加 0.5% 乌铵溶液
- 重新启动搅拌器
- 将所有管路与连接器弃置于医疗废物箱
- 清除 SHIME 操作柜上所有标签
- 将反应器盖、采样管及反应器夹具置于漏槽中，加入 0.5% 乌铵溶液浸泡至少 10 分钟。
- 针对试管架：取出内部螺母、小型试管及小型 O 型圈，收集于盛有 0.5% 乌铵溶液的塑料容器中，搅拌 1 小时后用自来水冲洗，蒸馏水漂洗并晾干。
- 刷洗反应器盖与采样管上所有接口，用流动自来水冲洗后以蒸馏水漂洗，置于实验纸上晾干。
- 针对采样管：将一端浸入 0.5% 乌铵溶液，同时使用注射器从另一端进行冲洗。另需采用微型刷清洁采样管内部。  
提示：用镊子夹住微型刷尾部，可轻松将其从采样管后端推至前端。
- 清洗反应器夹具，自来水冲洗后置于实验纸上晾干。
- 关闭搅拌器。
- 使用刷子清洁反应器内壁。
- 清空反应器（此时可将反应器内液体转入专用容器）。
- 关闭温水浴。
- 断开反应器与温水浴的连接：先断开反应器上部连接点，再移除下部连接点，使夹套壁内的水流入废液容器。
- 为反应器连接点加盖红色保护帽。
- 用自来水冲洗 SHIME 反应器、黑色 O 型圈及磁力搅拌子。
- 将 SHIME 反应器、黑色 O 型圈及磁力搅拌子移送至洗碗机。确保 SHIME 反应器连接点已加盖红色保护帽。若为致病性 SHIME 或含抗生素 SHIME 实验，需在清洗前对反应器进行高压灭菌！

- 排空温水浴槽。
- 取出气体捕集装置的肖特瓶与专用盖进行清洁。
- 移除系统中的通风过滤器，用铝箔包裹并标注高压灭菌标识，置于灭菌盒中进行高压灭菌。
- 从冰箱中取出搅拌器，使用乌铵溶液清洁。
- 使用乌铵溶液清洁实验台面上的搅拌器并移离台面。
- 先用乌铵溶液清洁实验台面，再使用肥皂进行清洁。
- 关闭 SHIME 操作柜：需先关闭 Windows 系统，待电脑完全关机后方可切断操作柜电源开关。

## 4 相关方案

### 4.1 采样

从 SHIME 模型中采集样本可用于多种目的：(1) 分析 SHIME 实验过程中微生物活性与组成的变化；(2) 将 SHIME 微生物群落作为批实验的接种物使用；(3) 质量控制。

#### 4.1.1 液体样本采样

从 SHIME 反应器（见下图）中采集液体样本的操作步骤如下：

- 将一支鲁尔锁注射器（通常为 10 mL）连接至取样阀。请勿使用容量小于 10 mL 的注射器，因其体积过小无法实现取样管内内容物与反应器内物质的充分混合，从而导致所采集样本无法准确代表反应器中的实际情况。
- 打开封闭硅胶管的塑料夹。
- 抽取 4 mL SHIME 悬浮液，随后将注射器从取样阀上移开。
- 弃去该液体。此步骤用于排出注射器内的空气。
- 将注射器重新连接至取样阀。
- 抽取 SHIME 悬浮液。
- 关闭硅胶管上的塑料夹。
- 将注射器从取样阀上取下。
- 将样本移入 10 mL 离心管中。

注意：请勿将注射器长时间连接在阀门上，以免破坏反应器的厌氧环境。此外，压力积聚可能导致注射器柱塞脱落，并造成反应器内容物泄漏。

- 样本需立即分装并尽快冷冻保存。常见样本储存方式如下：

用于 DNA 提取：取 2 份 1 mL 样本置于离心管中， $5000 \times g$  离心 10 分钟，保存上清液用于代谢物分析或细胞培养实验，沉淀物于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存用于 DNA 提取

用于短链脂肪酸（SCFA）分析：取 2 mL 样本置于 10 mL 离心管中

- 用于乳酸/铵离子（ $\text{NH}_4^+$ ）测定：取 1.5 mL 样本置于 2 mL 离心管中

（该样本需优先进行乳酸检测，因反复冻融会导致乳酸降解）

- 剩余样本（约 4.5 mL）可转移至备用管中保存；若需更多备份样本，可酌情增加 SHIME 悬浮液的取样量。



#### 4.1.2 磁珠取样

为从 M-SHIME 反应器中采集黏蛋白琼脂样本（注意：需从升结肠反应器开始操作，随后依次处理横结肠与降结肠反应器，以降低系统内的氧气渗入量），需确保在培养液转移至首个结肠反应器前完成磁珠更换。若为全自动 SHIME 系统，应在更换磁珠期间暂停系统运行（若即将进行泵操作，则选择暂停模式）：

- 黏蛋白琼脂磁珠的更换（长期实验适用）

准备托盘与铝箔用于固定 M-SHIME 袋，避免液体溅出。操作间隙需备有纸巾与乙醇用于清洁手套。建议使用纸箱式“阶梯凳”抬高托盘，使其更接近反应器盖口

打开首个反应器（最靠近冲洗通道起端的反应器），取出磁珠袋置于托盘内，并将反应器盖轻置于反应器上方

迅速打开含磁珠的 M-SHIME 袋，将半数旧磁珠（使用 3-4 天）更换为新批次磁珠（需确保使用相同颜色的束带）。除待插入袋中的磁珠外，避免接触其他清洁磁珠（操作后需擦拭手套）

- 无需取样：将旧磁珠置于密封容器中。
- 需取样：将磁珠移至称量舟中。

更换完成后，用纸巾清洁手套并将 M-SHIME 袋重新浸入 SHIME 悬浮液中。

关闭反应器。

按上述流程依次处理后续反应器。操作顺序应从最靠近冲洗通道起端的反应器/单元向最远端推进。建议优先更换全部 PC/AC（近端结肠/升结肠）反应器中的磁珠，再处理 TC（横结肠）和/或 DC（降结肠）反应器，以避免 DC 反应器悬浮液对 PC/AC 造成污染。

每个 SHIME 单元的冲洗时间应不少于程序运行时的冲洗时长。

检查所有搅拌磁子是否未被遮挡。

重新启动 SHIME 程序。

使用铵类消毒剂清洁托盘与操作台。

➤ 黏蛋白琼脂取样

- 将同一容器中的珠粒浸入盛有 100 mL 磷酸盐缓冲液的样品烧杯中，重复浸洗 5 次。
- 更换新的样品烧杯，加入 100 mL 磷酸盐缓冲液，将珠粒重复浸洗 5 次。
- 在离心管中放入三支经高压灭菌的 1 mL 吸头。
- 加入一个装有珠粒的 M-SHIME 袋。
- 对所有容器重复上述操作。
- 将离心管以 3000 rpm 离心 20 秒。
- 如需要，将离心管中的 M-SHIME 袋更换为同一容器中另一装有珠粒的已取样 M-SHIME 袋。
- 将离心管以 3000 rpm 离心 20 秒。
- 从离心管中取出 M-SHIME 袋及 1 mL 吸头。
- 充分涡旋离心管，必要时可用刮刀手动混匀。
- 立即分装黏蛋白琼脂样品，并尽快于 -20°C 冷冻保存（通常仅将 0.25±0.01 g 样品储存于 EP 管中用于 DNA 提取）。

特别注意：

- 在 SHIME 运行期间，需在添加营养培养基/胰液前后的同一时间点采集样本。细菌在添加营养物的最初几小时内活性显著增强。此外，无

短链脂肪酸（SCFA）的 SHIME 营养培养基/胰液的输入会稀释 SCFA 的浓度。为避免结果出现偏差，应规范采样时间：

- 通常于营养培养基输入前采样（例如 11:30）
  - 若需检测酶活性或易降解底物（如葡萄糖），建议在添加新鲜培养基 1 小时后采样
  - 需注意：新鲜培养基的加入也会稀释代谢物（如 SCFA/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>）的浓度。
- 建议单次取样量不超过 SHIME 反应器内培养物体积的 10%。若需更大样本量，应在营养培养基/胰液输入后收集悬浮液——可在废液泵启动前从远端结肠取 200 mL 样本，近端区域则应避免抽取过多液体。
- 冲洗过程中取样需谨慎，因高压可能导致注射器脱落并使 SHIME 反应器内培养物迅速排空。
- 提取黏液琼脂样本或更换磁珠时需特别注意，避免对照反应器/样本被处理组样本（如益生菌处理组）污染。

#### 4.2 如何制备粪便接种物

将粪便样本在厌氧磷酸盐缓冲液中均质化，并通过离心去除较大颗粒。此后，该混合物可用于接种 SHIME 或批量实验。

所需仪器与材料：

	Company	Serial nr.
<b>BagMixer® 400</b>	Interscience	1204211645
<b>Stomacher holder and bags</b>	Voor 't Labo	-
<b>Hettich Centrifuge (1401)</b>	Voor 't Labo	0005856-03-00
<b>50 mL Falcon tubes</b>	Greiner bio-one	227270

制备厌氧磷酸盐缓冲液：

Product	Amount	CAS nr
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>8,8 g</b>	<b>7758-11-4</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>6,8 g</b>	<b>7778-77-0</b>
<b>Sodium thioglycolate</b>	<b>0,1 g</b>	<b>367-51-1</b>
<b>Demi H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 mL</b>	

调节 pH 至 7.0（通常无需调整），煮沸或高压灭菌使其达到厌氧状态

使用前加入硫代硫酸钠（15 mg/L，CAS 编号 7775-14-6）

室温保存

- 请捐赠者或志愿者将粪便样本收集于白色样本盒中。捐赠后须立即打开厌氧产气袋（3.5 L；Oxoid，AN0035A）包装，将其与样本共同置于样本盒内并严密盖紧



- 如条件允许，应立即开始样品制备；否则，需将样品容器置于 4°C 环境下保存。
- 如需避免气味扩散，应在通风橱中继续后续制备操作。
- 将金属样品架置于天平上，取两个均质袋嵌套放置后固定于金属支架中。
- 制备 20% (w/v) 的粪便样品-磷酸盐缓冲液混合液，例如：将 20g 粪便样品与 100mL 磷酸盐缓冲液混合（每袋中最多可处理 60g 粪便样品及 300mL 缓冲液）。
- 将装有粪便样品和缓冲液的袋子放入 BagMixer® 匀浆机中，均质化处理 10 分钟。
- 关闭 Stomacher 设备，确保袋口固定牢固。
- 检查悬浮液是否均匀，如不均匀则继续均质化处理 5 分钟。
- 将粪便悬浮液转移至 50mL 离心管中并盖紧管盖。
- 以 500 g/rcf 的离心力离心 2 分钟。
- 收集上清液，将其作为最终的粪便悬浮液使用。
- 每 100mL 最终 SHIME 悬浮液中接种 5mL 粪便接种物。
- 对于标准成人 TWIN-SHIME 模型，具体分配如下：
  - 升结肠：500mL 体系接种 25mL 接种物
  - 横结肠：800mL 体系接种 40mL 接种物
  - 降结肠：600mL 体系接种 30mL 接种物
- 对于婴儿三联 SHIME 模型，则为：

- 近端结肠：300mL 体系接种 15mL 接种物
- 远端结肠：500mL 体系接种 25mL 接种物

**注意事项：**

样本捐赠后应尽快制备粪便悬液。捐赠、制备及使用粪便悬液的时间间隔越长，专性厌氧菌的死亡率越高。为减少氧气暴露，可在样本收集盒中添加厌氧产气袋。此外，操作过程需迅速且连贯。在接收粪便样本前，应确保已备齐实验方案所需全部材料。

若样本在制备接种物前需保存，请将其置于 4°C 条件下储存。细菌在代谢活性较低时（如此处的缺氧环境下）所受胁迫较小。

如需制备多份粪便样本：可同时均质化两份样本（将两个独立样本袋置于 Stomacher 均质袋中操作）。

需注意：粪便样本内容物未知，可能含有病原体、药物残留物、血液等成分。

#### 4.3 含冷冻保护剂的样本储存方法

**试剂**

Product	Supplier	Cat no	Storage conditions
DMSO	VWR	23486.297	Room temperature
Disolol	Chem-lab	CL00.1807.5000	Room temperature
Cystein-HCl	ACEF/Merck	001888/2430-100GM	Room temperature
Sodium chloride (NaCl)	VWR	27810.295	Room temperature
D-Trehalose dihydrate	Sigma	T5251-100G	Room temperature
Tryptone Soya Broth	Oxoid	CM0129	Room temperature
Resazurin	Alfa Aesar	B21187	Room temperature
K2HPO4	Chem-lab	CL00.1155.1000	Room temperature
KH2PO4	Chem-lab	CL00.1146.1000	Room temperature
Sodium thioglycolate	Applichem	A2832	Room temperature
Sodium dithionite	Merck	1.06507.0500	Room temperature
Liquid Nitrogen	-		Room temperature

**准备工作：**

- 70% 乙醇（disolol）
  - 向一个空的 5 升乙醇容器中加入 3.5 升乙醇
  - 加入 1.5 升蒸馏水

- 使用该混合溶液填充乙醇喷瓶
- 于室温条件下储存
- 无氧二甲基亚砷（DMSO）的配制（仅配制所需用量！）
  - 将带有丁基橡胶塞的 250 毫升瓶子进行高压灭菌处理
  - 在层流洁净台中用乙醇对丁基橡胶塞进行消毒
  - 使用 50 毫升注射器及绿色针头，穿过丁基橡胶塞注入 110 毫升 DMSO
  - 通过向瓶中通入纯氮气，使瓶内环境达到无氧状态
  - 用乙醇再次消毒丁基橡胶塞
  - 将带有滤器的大型绿色针头插入橡胶塞中，用于通入纯氮气
  - 将带有过滤器的细小绿色针头穿过隔垫插入，用于排出纯氮气
  - 对瓶体进行持续 1 小时的吹扫
  - 先取出出口针头，再移除进口针头
- 冷冻保护剂溶液（仅配制所需用量！）
  - 于 1 L 肖特瓶中加入下列组分：

Product	Amount
<b>Cystein-HCl</b>	<b>0.5 g</b>
<b>Trehalose</b>	<b>10 g</b>
<b>Tryptone Soya Broth</b>	<b>3 g</b>
<b>NaCl</b>	<b>17 g</b>
<b>Distilled H<sub>2</sub>O</b>	<b>900 mL</b>

- 使用丁基橡胶塞密封
- 至少煮沸 1 分钟
- 立即用丁基胶塞封闭瓶口
- 对密闭瓶体进行高压灭菌
- 储存于厌氧工作站中
- 在厌氧工作站中，使用 50 mL 注射器与绿色针头，向已灭菌的冷冻保护剂中加入 100 mL 厌氧二甲基亚砷（DMSO）（终浓度 10%）。

➤ 连二亚硫酸钠储备液:

- 于 12 mL 试管中配制连二亚硫酸钠储备液

Product	Amount
<b>Sodium dithionite</b>	<b>75 mg</b>
<b>Distilled H<sub>2</sub>O</b>	<b>5 mL</b>

- Store in the fridge for maximally 2 days.

厌氧磷酸盐缓冲液:

- 于肖特瓶中配制厌氧磷酸盐缓冲液

Product	Amount
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>8.8 g</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>6.8 g</b>
<b>Sodium thloglycolate</b>	<b>0.1 g</b>
<b>Distilled H<sub>2</sub>O</b>	<b>1000 mL</b>

- 调节 pH 值至  $7.0 \pm 0.05$
- 高压灭菌
- 室温保存
- 使用前，按每升磷酸盐缓冲液加入 1 mL 连二亚硫酸钠储备液（终浓度=15 mg/L），需使用移液管进行操作

操作步骤:

为每个青霉素瓶配制 10%接种物

- 使用最小液氮储罐向便携式液氮容器中充入液氮。需穿戴适当防护装备（实验服、防冻手套及护目镜）!!
- 按照操作手册流程制备 SHIME 悬浮液，但均质时间改为 3 分钟（而非 10 分钟）。对于 SHIME 实验，称取 40 克/100 毫升（替代原 20 克/100 毫升）
- 尽快将 SHIME 悬浮液转移至厌氧工作站
- 根据需冻存体积，选择 Falcon 管、12 毫升塑料管或冻存管，装入 50%体积的冷冻保护剂溶液
- 加入 50%体积的 SHIME 悬浮液

- 颠倒混匀 5 次
- 容器内总体积不得超过最大容量的 80%（例如 50 毫升 Falcon 管中最大体积为 40 毫升）
- 在管壁标注内部液体体积
- 立即将样品置于便携式液氮容器中。务必佩戴防冻手套！！
- 根据体积大小进行速冻：小体积样品 10 分钟，50 毫升样品 20 分钟
- 使用专用镊子将冷冻样品从便携容器中取出！！
- 将冷冻样品存于-80°C冰箱

#### SHIME 接种物解冻步骤：

- 从-80°C冰箱中取出冷冻样品，置于 37°C水浴中解冻
- 向每个 SHIME 反应器中加入 5%解冻接种物

#### 4.4 SHIME 实验培养基配制

- 取洁净肖特瓶并做好标记
- 加入所需体积一半的纯水
- 按比例称取塑料杯中的粉末混合物，直接加入瓶中：对照组期间添加淀粉，处理组期间添加目标化合物（若适用，可同时添加淀粉）（参见章节 1.2.2.5 与 2.1；重要提示：当添加胃蛋白酶时，饲料化合物应溶解于原体积 80%的溶液中！）

- 剧烈振荡混匀
- 加入水至规定体积（通常为 2 L，若添加胃蛋白酶则为 1.6 L）

剧烈振摇并立即进行高压灭菌（或煮沸）（此举旨在避免营养培养基中化合物发生堵塞与沉淀，否则可能影响培养基的泵送效率及各 SHIME 单元间进料的均匀分布）

- 高压灭菌后立即剧烈振摇
- 使用前，在通风橱环境下用 37%盐酸酸化至目标 pH 值（成人培养基为 2.0，婴儿培养基为 3.9）

备注：

一旦配制完成并经高压灭菌后，SHIME 培养基可于室温保存。为提高时间利用效率，可一次性配制供连续数日或数周使用的培养基，但建议单次配制量不宜超过两周的使用需求。

若需评估处理效应，特定化合物应在高压灭菌后而非灭菌前加入。

在处理期间可采用两种策略：一是在膳食基础上添加待测产物；二是移除部分淀粉并以待测产物替代。后者旨在使对照组与处理组在碳源总量上保持一致。

若高压灭菌后瓶底出现结块现象，表明灭菌前未充分混匀，应弃去该瓶培养基，重新配制并确保灭菌前彻底混匀。

#### 4.5 SHIME 实验中胰液/胃蛋白酶溶液的配制

- 胃蛋白酶在胃内消化过程中起重要作用，而胆盐与胰酶则通过促进脂肪乳化、抑制细菌过度生长并将膳食中可溶性成分降解为可吸收的小分子单元，对小肠生理功能具有关键意义。
- 取洁净肖特瓶，加入 1 或 2 L 蒸馏水。
- 使用前即刻将定量成分（参见第 2.1 节）置于塑料杯中加入瓶中。
- 充分混匀后密闭冷藏保存（最长 5 日）。

注：

实验所需酸液与碱液均需现用现配，并于实验期间保存于冰箱内。

瓶内液体冷藏后可能出现轻微浑浊，此属正常现象。每次更换胰液/胃蛋白酶溶液时，请使用洁净的新瓶子。

#### 4.6 SHIME 实验用酸碱的制备

建议使用如下图所示适用于封闭循环系统的酸碱容器



可使用以下酸/碱容器：

Product	Supplier	Product code
NaOH (0.5M)	Chem lab	CL02.1443.5000
HCl (0.5M)	Chem lab	CL05.0310.5500

在制备酸碱溶液时，可按以下步骤操作：

- 酸液 (0.5 M HCl)：取 80 mL 37% 盐酸加入 1920 mL 纯水中（注意：应将酸加入水中，而非反向操作；操作需在通风橱中进行）。
- 碱液 (0.5 M NaOH)：将 40 g 氢氧化钠溶于 2 L 纯水中。

注：

在进行 SHIME 实验中使用益生元时，需监测酸碱消耗量。当使用高剂量益生元（例如 10 g/L AXOS）时，样品发酵后的酸化反应可能较为剧烈（尤其在实验初期，SHIME 反应器中充满大量新鲜营养培养基时）。此时建议采用较高浓度的酸和碱溶液（1.0 M），以减少维持 pH 所需液体的体积，从而降低稀释率。

#### 4.7 黏蛋白微球的制备与更换

每个 M-SHIME 培养单元中包含置于一个袋内的 4 组载体，每组 15 个（即每单元共 60 个载体）。为模拟黏液层的更新，每周应更换其中 50% 的微球，共进行三次。

	Carriers per vessel	Number of vessels	Total
<b>START-UP</b>	<b>60</b>	<b>6</b>	<b>360</b>
<b>Monday</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>180</b>
<b>Wednesday</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>180</b>
<b>Friday</b>	<b>30</b>	<b>6</b>	<b>180</b>
<b>Amount for 1 week</b>			<b>540</b>

(1) 制备黏蛋白琼脂：

- 每单元需使用 60 个包被黏蛋白的载体，每 60 个载体约需制备 40 mL 黏蛋白琼脂
- 若存在两个培养单元，则需 80 mL 黏蛋白琼脂（建议制备 100 mL）
- 将 100 mL 蒸馏水置于（250 mL）肖特瓶内，预热至约 70°C（注意：所

用肖特瓶体积应为待制备液体体积的 2-3 倍，因黏蛋白琼脂需经煮沸步骤)

- 加入 1 g 琼脂与 350  $\mu\text{L}$  10 M NaOH 溶液
- 轻轻旋摇至琼脂完全溶解
- 缓慢加入 5 g II 型猪胃黏蛋白（于约 70°C 条件下），并旋摇混匀
- 将黏蛋白琼脂煮沸三次，每次煮沸后静置 2 分钟，各次之间充分摇匀。

煮沸时应将瓶盖部分闭合

(2) 载体包被（于层流超净工作台内进行）：

- 向 50 mL 离心管中加入 40 mL 载体
- 加入黏蛋白琼脂至完全浸没载体
- 使用无菌镊子将微球从离心管中取出，以每组 15 个为单位成行排列于铝箔上。操作时应使微球带孔的一侧保持倾斜（即勿将孔面朝下放置），且彼此不得接触，以确保黏蛋白琼脂保留在孔内

- 将微球（开口朝向侧方）静置于铝箔上冷却，使黏蛋白琼脂凝固

重要提示：在 Falcon 管中的黏蛋白琼脂会逐渐冷却并最终凝固。需定期将含有黏蛋白琼脂的 Falcon 管内容物倒入 Schott 瓶中，必要时可加热以避免凝固。此外，若琼脂温度不足，将无法充分凝固

- 使用网袋分批装入载体，每袋 15 粒。仅选用完全填充黏蛋白琼脂的载体。同时应确保可区分不同实验组别，例如：在周一与周五制备的黏蛋白包被载体中加入一个空载体，而周三组则不添加，以便于识别每日需更换的载体

- 若需短期保存（数小时），可将载体置于铝箔中并存放于冰箱；若需长期保存，则需在灭菌烧杯中加入少量无菌蒸馏水，将载体悬挂于杯侧（避免接触水面，水的功能为使气相水蒸气饱和），再整体存放

(3) 准备聚乙烯袋，用于在 SHIME 实验首日将载体置于 SHIME 反应器内部。

(4) 按照第 4.1.2 节所述方法更换载体。