

# 幽门螺杆菌的低温保存方法

□ 张建中 蒋秀高 陈晶晶 孙兆军 盛涛

R 573

R 378.2

## Long-term freezing storage of *Helicobacter pylori*

ZHANG Jian-Zhong, JIANG Xiu-Gao, CHEN Jing-Jing, SUN Zhao-Jun and SHENG Tao

Diarrhea Disease Lab., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206, China

**Subject headings** *Helicobacter pylori*; bacterial storage; freeze storage

### Abstract

**AIM** To improve the freezing storage results of *H. pylori* strains.

**METHODS** Using cryopreservative solution (containing 10 mL/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum), 138 *H. pylori* isolates were stored under  $-62^{\circ}\text{C}$  condition. The bacteria were tested each 6 months by culture in the media (Brucella agar with 100 mL/L sheep blood) at microaerophilic environment (100 mL/L  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{O}_2$  and 850 mL/L  $\text{N}_2$ ), at  $37^{\circ}\text{C}$  for 3 days.

**RESULTS** All of the isolates tested were recovered except one isolate (CAPM N107 after 18 months) after two years of storage. The investigation on 7 isolates prolonged to three years and the subcultures are still successful.

**CONCLUSION** The cryopreservative solution (containing 100 mL/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum, without dimethylsulfoxide, DMSO), is suitable for the freezing storage of *H. pylori*. Most isolates can be stored for up to two years or longer. This preservative method is easy for routine use.

**主题词** 螺杆菌; 幽门; 细菌保存; 冷冻保存  
中国图书资料分类号 R 573

### 摘要

**目的** 探索幽门螺杆菌实用性的低温保存方法。

**方法** 采用以 100 g/L 蔗糖、500 mL/L 小牛血清作为幽门螺杆菌冷冻保存液, 对 138 株幽门螺杆菌在  $-62^{\circ}\text{C}$  条件下进行保存, 每 6 个月进行一次菌株复活, 检查菌株存活情况。

**结果** 除一株国内分离株 (CAPM N107 株) 在 18 个月时复活失败外, 其他菌株在保存 2.5 年后均复活良好, 其中对 7 株菌株的观察已达 3 年, 仍能成功复活。

**结论** 幽门螺杆菌菌株冷冻保存过程中, 若使用 100 g/L 蔗糖小牛血清保存液 (不含二甲亚砜), 配方简单, 同时可免去在  $-20^{\circ}\text{C}$  环境的预冻过程, 大大简化了操作过程。菌株保存期一般可达 2 年以上, 适合各科研单位常规保存幽门螺杆菌菌株。

### 0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染相关性疾病已受到国内外广泛关注, 在 Hp 的基础性研究中, 菌株的低温冷冻保存能给科研工作带来很大方便, 但存在保存期较短的问题, 往往需经常复活和保存菌株。我们近 10 年对多种冷冻保存液在 Hp 冷冻保存中进行了应用和比较, 并针对 Hp 的具体情况完成了对保存液的改进, 现介绍如下。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 菌株: 共采用经系统鉴定的 138 株 (其中国内分离株 124 株, 国际标准菌株 2 株和爱尔兰分离株 12 株)。冷冻保存液: 用蒸馏水配制 200 g/L 的蔗糖溶液, 经  $115^{\circ}\text{C}$ , 30 min 灭菌后, 将蔗糖溶液与经灭活的小牛血清按 1:1 比例混合, 即成为本实验所用菌株保存液。

**1.2 方法** 将冻存液约 0.2 mL 分装在各 1.5 mL 离心管或螺口冻存管中, 放  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。临用前将保存液取出, 室温溶化, 用取菌环直接刮取少许新鲜培养的 Hp, 放入保存液中 (约  $10^{12}$  cfu/L), 并直接放入  $-62^{\circ}\text{C}$  环境保存, 每株细菌保存多支, 每 6 个月取出保存菌株, 分别接种含 100 mL/L 羊血的布氏琼脂平板后, 置  $37^{\circ}\text{C}$  混合气体 (100 mL/L  $\text{CO}_2$ , 50 mL/L  $\text{O}_2$  和 850 mL/L  $\text{N}_2$ ) 环境培养 3 d, 检测细菌存活情况。

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 102206

张建中, 男, 1964-01-05 生, 山东省东营人, 汉族。1984 年山东医科大学医学系毕业, 1992 年中国预防医学科学院硕士, 副主任, 副研究员, 主要从事幽门螺杆菌相关研究, 承担全国幽门螺杆菌协作组菌株库的构建和管理工作。

**通讯作者** 张建中, 102206, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所腹泻病研究室, 北京市昌平区流亭 5 号 02 室

**Correspondence to:** Dr ZHANG Jian-Zhong, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Changping, Beijing 102206, P. O. Box 5, China

Tel +86-10-61739456, Fax, -86-10-61739456

E-mail: Helico@public.bta.net.cn

收稿日期 1998-07-06

## 2 结果

在观察菌株中,除一株国内分离株(CAPM N107株)在18 mo时复活失败,其他菌株在保存2.5 a后均复活良好,其中对7株菌株的观察已达3 a,仍能复活成功。

## 3 讨论

Hp 冷冻保存常规实验室操作带来很大方便,但长期以来存在可靠保存期短,复活率低的问题,以致于造成多个临床和基础研究单位经常发生菌株丢失。国内外曾经在此领域作过多方面探索,用过的冷冻保存液有脱脂奶粉、布氏肉汤、脱脂奶粉加170 mL/L甘油、布氏肉汤加200 mL/L甘油、Stuart 传送培养基、布氏肉汤加100 mL/L小牛血清、含150 mL/L甘油的10 g/L蛋白胨、含150 mL/L甘油的大豆胨肉汤、心脑浸液、灭活血清以及脱纤维马、兔或绵羊全血等多种<sup>[1-7]</sup>;一般在-70℃条件下,在大豆胨肉汤、心脑浸液、灭活血清中Hp 仅可存活数周,在脱纤维全血中可存活0.5 a,也有在脱纤维全血中加入100 mL/L甘油可保存Hp 达2 a以上的报道,但此保存配方在实际应用中仍不十分方便。我们在工作中发现,Hp 对冰晶损伤非常敏感,经反复2次冻溶的菌株一般不能复活成功。因此,我们选用了细胞内外均有良好防止冰晶形成的蔗糖成分作为保存液的主要成分,而且明显加大了小牛血清在

保存液中的比例,实验取得了满意效果。二甲基亚砷往往在一般细菌冷冻保存液中被采用,但在Hp 菌株冻存过程中,可在复活阶段造成明显的毒性作用,使用100 g/L蔗糖小牛血清时可完全避免二甲基亚砷的使用,提高了Hp 的复活率。

延长Hp 冷冻保存期的关键是延缓细胞内冰晶的生长,要求温度降到-50℃以下,我们在本次实验中选择-62℃作为菌株保存温度,改变了以往在-80℃条件下保存的办法。实验表明保存结果仍然满意,因对冰箱的要求明显降低,更易于建立保存条件。Hp 菌株冷冻保存过程中,若使用100 g/L蔗糖小牛血清保存液,可免去在-20℃环境的预冻过程,大大简化了操作过程。

## 4 参考文献

- 1 Han SW, Flamm R, Hachem CY, Kim HY, Clarridge JE, Evans DG *et al*. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1995;14(4):349-352
- 2 Langenberg W, Rauws EAJ, Widjokusumo A, Tytgat GNJ, Zanen HC. Identification of *Campylobacter pyloridis* isolates by restriction endonuclease DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1986;24(3):414-417
- 3 Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 1987;25(12):2378-2379
- 4 Ribeiro CD, Gray SJ. Long term freeze storage of *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Pathol*, 1987;40(10):1265
- 5 Buck GE, Smith JS. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. *J Clin Microbiol*, 1987;25(4):597-599
- 6 Morgati DR, Freedman R, Depew CE, Kraft WG. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J Clin Microbiol*, 1987;25(11):2123-2125
- 7 Shahamat M, Paszko-Kulva C, Mai UE, Yamamoto H, Colwell RR. Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J Clin Pathol*, 1992;45(8):735-736

# 本刊中、英文版加入 ChinaInfo 信息服务系统

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,经研究决定,本刊中、英文版入网“ChinaInfo(中国信息)网络资源系 ChinaInfo 信息服务系统,进入因特网提供信息服务。凡有不同意见将自己稿件纳入因特网传送交流的作者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

ChinaInfo 系统是由国家科委创办,国家科委信息司组织实施,中国科技信息研究所万方数据网络中心编辑制作的开放式因特网信息资源系统,《电子期刊》是该系统中的重要信息服务栏目之一,将在年内逐步制作编入200种科技期刊的全文内容。本刊内容将采用原文照录方式制作编入 ChinaInfo 系统电子期刊栏目,读者可上因特网进入 ChinaInfo 系统免费(明年开始酌情收费)查询检索本刊内容,也欢迎各界朋友通过 ChinaInfo 系统提供的公告牌向我刊提出宝贵意见和建议或征订本刊。

电子版网址:<http://www.chinainfo.cn.net/periodical> 或 <http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>。

(本刊编辑部)