

# 幽门螺杆菌的冷冻干燥保存方法

□ 张建中 蒋秀高 陈晶晶 孙兆军 盛涛

R 573

R 378.2

## Dry-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*;  
Helicobacter infection; freeze storage

### Abstract

**AIM** To observe the dry-freezing storage results of *H. pylori* strains.

**METHODS** Fifteen *H. pylori* isolates and three *C. jejuni* isolates ( $10^{13}$  cfu/L) were used in this study. The dry-freezing storage solution (containing 10 g/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum) was used, and the skim milk was used as control. The dry-frozen bacteria were tested each year by culturing in the media (Brucella agar with 100 mL/L sheep blood) in microaerophilic environment (100 mL/L CO<sub>2</sub>, 50 mL/L O<sub>2</sub> and 850 mL/L N<sub>2</sub>) at 37°C for 5 days

**RESULTS** After dry-freezing, all of the *H. pylori* isolates (15/15) and *C. jejuni* isolates (3/3) can survive for at least 4 years. But the skim milk was not useful in *H. pylori* dry-freezing storage

**CONCLUSION** The solution (100 g/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum) can be used successfully in the dry-freezing storage of *H. pylori* isolates and *C. jejuni* isolates.

**主题词** 螺杆菌, 幽门; 螺杆菌感染; 冷冻干燥保存  
中国图书资料分类号 R 573

### 摘要

**目的** 介绍一种较理想的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的冷冻干燥保存方法, 希望对 Hp 相关研究有所帮助。

**方法** 以 100 g/L 蔗糖、500 mL/L 小牛血清作为冻干保护剂对 15 株 Hp( $10^{13}$  cfu/L 菌液)和 3 株空肠弯曲菌进行冷冻干燥保存, 同时用脱脂牛奶冻干保护剂作为对照。按常规菌株冻干程序冻干后火焰封管, 真空放电检查冻干管真空度良好后, 存放于室温环境, 用于冻干效果观察。冻干菌株每年进行复活检查, 复活时接种双份布氏血平板, 置混合气体环境(100 mL/L CO<sub>2</sub>, 50 mL/L O<sub>2</sub> 和 850 mL/L N<sub>2</sub>)培养 5 d 后观察细菌复活情况。

**结果** Hp 冻干菌株 15 株经 4 a 复苏观察发现均存活良好, 其中已有 2 株冻干菌株观察时间已达 6 a, 仍存活良好。

**结论** 以蔗糖血清为主的冻干保护液在 Hp 菌株冻干中具有良好的保护效果, 冻干菌株可达到长期保存的目的。同时, 此保护剂可有效用于弯曲菌属细菌和其他螺杆菌属细菌的冻干保存

## 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, 但在 Hp 的基础性研究中, 普遍感到 Hp 的分离比较容易, 做到对分离菌株的传代则比较困难, 要完成对 Hp 的长期保存则更加困难, 很多研究单位因不能获得长期稳定的菌株, 不得不停止相关研究。在实验室中关键菌株长期、稳定保存的首选方案是对菌株进行冻干保存。我们最近 10 a 在 Hp 相关研究过程中, 对多种冻干保护剂在 Hp 冻干保存中, 进行了应用观察和比较, 并针对 Hp 的具体情况完成了对保存液的改进。现将我们认为较满意的一种冻干保护剂和冻干方法介绍如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用菌株为本室保存的 NCTC11637, CAMPZ-2 等 15 株, 另有 3 株空肠弯曲菌菌株(本室保存)。实验前各菌株均经过系统鉴定。

冻干保护剂配制: 用蒸馏水配制 200 g/L 的蔗糖溶液, 经 115°C, 30min 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, 保存液平时可置普通冰箱冷冻备用。

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京市 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微生物研究室, 北京市昌平区流苏 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

1.2 方法 在每支冻干管底部加少许脱脂棉作为支持物,高压灭菌后备用。冻干时,每支冻干管内放入用培养72 h的 Hp 制备的  $10^{13}$  cfu/L 菌液约0.1 mL,以使管底部的脱脂棉刚好浸透为宜。将装有 Hp 菌液的冻干管依次经  $-20^{\circ}\text{C}$  和  $-80^{\circ}\text{C}$  预冻后,按常规菌株冻干程序冻干后火焰封管,真空放电检查冻干管真空度良好后,用于冻干效果观察。实验中同时采用脱脂牛奶作为对照用保存液。冻干菌株每年进行复活检查,复活时将冻干管打开,用布氏肉汤0.2 mL左右冲洗管底冻干物,并立即接种双份布氏血平板,置混合气体环境 ( $100\text{ mL/L CO}_2$ ,  $50\text{ mL/L O}_2$  和  $850\text{ mL/L N}_2$ ) 培养5 d后观察细菌复活情况。

## 2 结果

Hp 冻干菌株 15 株经4 a复活观察发现均存活良好,其中已有两株冻干菌株观察时间已达6 a,仍存活良好。对照用脱脂牛奶保护剂组,15 株冻干菌株在冻干后,立即进行复活实验,均未复活成功。3 株空肠弯曲菌冻干菌株经4 a复活观察发现均存活良好。

## 3 讨论

国内外各个细菌学研究机构,均将菌株的冻干保

存作为常规菌株保藏方法,对于一般细菌,脱脂牛奶即可作为有效的冻干保护剂用于菌株的冻干过程。但在 Hp 菌株的冻干过程中,不但脱脂牛奶不能使用,其他多种保存液也不能有效地用于此过程<sup>[1]</sup>。各国 Hp 的主要研究机构都致力于保护剂的研究<sup>[2]</sup>,使目前冻干菌株的复活率明显提高(一般可达50%左右),但各自的配方多数未公开交流。我们在本研究发现,以蔗糖血清为主的冻干保护液在菌株冻干中具有良好的保护效果,可能是蔗糖作为一种细胞内外双重保护剂,有效地降低了 Hp 冻干过程中细胞内外的冰晶损伤,配方中取消了常规配方中的二甲基亚砷成分,减少了对 Hp 复苏过程的毒性。同时,此保护剂可有效用于弯曲菌属细菌和其他螺杆菌属细菌的冻干保存。

Hp 在冻干过程中对冻干条件的要求特别严格,特别是不能耐受各种不同程度的溶化现象出现。我们在常规冻干中,曾有3次出现轻度预冻后溶化,结果造成整批菌株冻干失败,因此应特别引起注意。

## 4 参考文献

- Westblom TU, Barthel JS, Havey AD, Gonzalez FJ, Tarka EF, Everett ED. Long term freeze storage of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Pathol*, 1987;40(3):353
- Spangler A, Gross A, Koltrawasser H. Successful freeze storage and lyophilisation for preservation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*, 1992;45(8):737

# WJG 被国际最负盛名的美国科学引文索引(SCI)收录

1998年9月2日,WJG (World Journal of Gastroenterology, 世界胃肠病学杂志)总编辑潘伯荣和马连生收到了美国科学信息研究所(ISI)总编 Luisa Rojo 发来的传真,报告了一个特大喜讯:从1998年第4卷第1期开始,WJG 被批准收录进入其科学引文索引(Science Citation Index, SCI)。目前为止 SCI 共收录了我国医学期刊2本,分别为 *Acta Pharmacologica Sinica*(中国药理学报),*Chinese Medical Journal*(中华医学杂志英文版)。

SCI是目前世界上最有影响的检索系统,共有5种版本出版,均为周刊,即印刷版(Print),磁盘(CC on Diskette, CCD),光盘(CC CD-ROM),磁带(CC Search Magnetic Tape)和电脑检索(CC Search Online)。以上主要提供的是目次与摘要服务。WJG 进入 SCI 标志着 WJG 杂志迈上了一个新的台阶,对促进国内外胃肠病学信息的交流及学科的发展有着重大的意义。由于 SCI 对科研成果、作者的科学水平、科技期刊的科学水平评价方面,建立了比较客观和定量的评价方式,越来越被我国及全球科技界、科技期刊出版界和胃肠病学专家所重视,能被 SCI 收录是作者、编者、读者共同努力的结果,也是我国老一辈胃肠病学专家及编辑出版界共同的理想,这一理想终于在今天得以实现,作为编辑工作者,我们感到荣幸和欣慰。

我们特别感谢马景云编审、肖宏副编审、陆汉明教授、巫协宁教授、纪小龙教授等对 WJG 做出的贡献。今后的路更长,工作更艰巨,我们将向着名符其实的世界一流医学期刊继续迈进!

(WJG 编辑部)

1998-09-18