

一种简便的幽门螺杆菌液体培养法的构建^{*}

李雅洁^{1,2,*}, 张晓怡^{1,2}, 周建奖^{1,2}, 赵艳^{1,2}, 龙妮娅^{1,2}, 陈学书^{1,2}, 王琴容^{1,2},
程薇^{1,2}, 谢渊^{1,2,**}

(1. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立一种简便、有效的幽门螺杆菌(*H. pylori*)的液体培养法。方法: 取脑心浸液 9 mL、胎牛血清 1 mL、*H. pylori* 选择剂(万古霉素、头孢磺啉、甲氧苄啶及两性霉素 B) 400 μL 制成 *H. pylori* 液体培养基, 将 *H. pylori* 接种于 *H. pylori* 液体培养基, 在厌氧罐中通过微需氧袋建立微需氧条件, 于 37 °C 振荡培养 3 d, 同时设立传统固体培养基培养的 *H. pylori* 作为对照; 观察 2 种方法培养的 *H. pylori* 生长状况及 *H. pylori* 形态, 比较 2 种方法培养的 *H. pylori* 的尿素酶、氧化酶及触酶试验结果。结果: 固体培养到第 3 天时, *H. pylori* 生长良好, 哥伦比亚血琼脂平板上见透明、针尖样菌落形态; 液体培养第 3 天时可见培养基明显浑浊, 涂抹少量菌液于无抗生素的哥伦比亚血琼脂平板培养, 肉眼未见污染菌生长, 并有透明、针尖样的菌落长出; 革兰染色后, 固体培养基中的 *H. pylori* 为螺旋状、海鸥状、S 状弯曲菌或短杆菌; 液体培养基中的 *H. pylori* 则多为螺旋短杆状、亦见部分长丝状细菌, 有的互相缠绕聚集成团, 有的散在分布; 取两种方法培养的 *H. pylori* 菌进行尿素酶、氧化酶及触酶试验, 结果均为阳性。结论: 成功建立一种简便、有效的 *H. pylori* 液体培养法, 细菌生长良好, 且 *H. pylori* 形态变长。

[关键词] 幽门螺杆菌; 液体培养; 脑心浸液; 革兰氏染色; *H. pylori* 选择剂; 微需氧

[中图分类号] R573.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)02-0160-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.02.006

A Simple Culture Method of *Helicobacter pylori* in Liquid Media

LI Yajie^{1,2}, ZHANG Xiaoyi^{1,2}, ZHOU Jianjiang^{1,2}, ZHAO Yan^{1,2}, LONG Niya^{1,2},
CHEN Xueshu^{1,2}, WANG Qinrong^{1,2}, CHENG Wei^{1,2}, XIE Yuan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Guizhou Medical University, Ministry of Education, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a simple and effective liquid culture method of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). **Methods:** *H. pylori* was inoculated into a T25 cell culture flask with 10 mL of brain heart infusion containing 10% fetal bovine serum, and 0.4% *H. pylori* selection agent (including vancomycin, cefsulazidine, methicillin and amphotericin B), incubated at 37°C for 3 days, where microaerophilic atmosphere was established by atmosphere generation systems of Thermo scientific. *H. pylori* were identified by urease test, oxidase test, catalase test and Gram stain. *H. pylori* grew on classic solid media as control and test results of urease, oxidase and catalase of the 2 groups were compared. **Results:** On the 3rd day of culture, *H. pylori* grew well on solid media. On Columbia sheep blood agar, there were needle tip-*H. pylori* like and transparent bacterial colonies. Liquid culture showed obvious turbidity, and when smeared on Columbia sheep blood agar, there were needle tip-*H. pylori* like and transparent bacterial colonies growing out without contamination. Gram staining showed

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金(31660031; 31560326), 贵阳市科技计划项目(20161001) 贵州卫计委科技基金(gzwiki2015-1-010), 贵州省科技合作计划项目[黔科合 LH 字(2015)7360]

^{**} 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

^{***} 通信作者 E-mail: xieyuan1974@163.com

网络出版时间: 2018-02-14 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180214.1220.013.html>

H. pylori on solid media appeared as heliciform, seagull-*H. pylori* shaped, and S-*H. pylori* shaped campylobacteria or brevibacteria. *H. pylori* in liquid media mostly showed as short screw, and some as long filaments, scattered or intertwining to cluster. The test results of enzymes from *H. pylori* cultured by the both 2 methods were positive. **Conclusion:** A simple and convenient method for *H. pylori* liquid culture is developed successfully. With this method *H. pylori* could grow well and some could have long-*H. pylori* shaped appearance.

[**Key words**] *Helicobacter pylori*; liquid culture; brain heart infusion; Gram stain; *H. pylori* selective agent; microaerophilic

自 1984 年马歇尔和沃伦^[1]成功从胃黏膜组织中分离得到幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)后,越来越多的研究证实 *H. pylori* 与胃炎、消化性溃疡及胃癌等疾病的发病密切相关^[2-4]。*H. pylori* 呈全球性分布,世界上半以上的人口曾感染过 *H. pylori*^[5],世界卫生组织已将其列为胃癌的一级致癌因子^[6]。*H. pylori* 培养检查的特异性 100%,是临床上诊断 *H. pylori* 感染的“金标准”^[7]。*H. pylori* 是一种呈“S”形、弧形或弯曲形的革兰阴性微需氧菌,对体外的培养条件要求非常严格^[8-11]。目前 *H. pylori* 的体外培养多以固体培养为主。对于该领域的科研工作者来说,方便、快捷的获得体外培养的 *H. pylori* 进行研究极为重要,在 *H. pylori* 疫苗制备方面,液体培养的方法则更方便 *H. pylori* 疫苗的各种毒力因子提取和检测。目前,国内外液体培养 *H. pylori* 的方法虽有些报道,但大多操作复杂,对实验室硬件要求较高。为此,本课题组以常规固体培养法作为对照,在前人液体培养法的基础上,根据实验室条件,建立了一种生长良好且简便实用的液体培养方法,报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与主要试剂

H. pylori 国际标准菌株 NCTC11639 由中国幽门螺杆菌菌株管理与保藏中心馈赠。主要试剂为哥伦比亚琼脂粉、*H. pylori* 选择剂 SR0147E、脑心浸液粉(Oxoid 公司,英国)、微需氧产气袋(Thermo Fisher,美国)、胎牛血清(Gibco,美国)、无菌脱纤维羊血(南京便诊生物科技有限公司)、5% 过氧化氢酶试剂(青岛海博生物技术有限公司)、幽门螺杆菌试纸(珠海克迪科技开发有限公司)、氧化酶试纸(杭州微生物试剂有限公司)、细菌革兰氏染液(南京建成科技有限公司)、T25 细胞培养瓶(Corning,美国)、密封罐(MGC Anaero Pack,日本)。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 固体培养 称取哥伦比亚琼脂粉 3.7 g,溶于蒸馏水 90 mL,118 ℃ 15 min 高压灭菌。待温度降至 45 ~ 50 ℃ 时,加入无菌脱纤维羊血 10 mL 和 *H. pylori* 选择剂 400 μL,混匀后趁热快速制板,待冷却后备用。将冻存的 *H. pylori* 标准株 NCTC11639 取出,并立即放入 37 ℃ 水浴至完全融化,然后接种于哥伦比亚血琼脂平板上,涂匀,放入厌氧罐,罐内置有微需氧产气袋(5% O₂、10% CO₂、85% N₂),37 ℃ 恒温,培养 3 d。

1.2.2 *H. pylori* 液体培养 称取脑心浸液粉 3.7 g 溶于双蒸水 90 mL 制成脑心浸液,118 ℃ 15 min 高压灭菌后,备用。临用时加入脑心浸液 9 mL、胎牛血清 1 mL、*H. pylori* 选择剂 400 μL 制成 *H. pylori* 液体培养基。将已固体培养 3 d 的 *H. pylori* 取出,刮取菌苔加入已预加 *H. pylori* 液体培养基(脑心浸液 + 10% 无菌脱纤维羊血 + 0.4% *H. pylori* 选择剂)10 mL 的 T25 细胞培养瓶中,混合均匀,然后置于厌氧罐中,加入微需氧产气袋建立微需氧环境(5% O₂、10% CO₂、85% N₂),保鲜膜包裹密封后置于空气摇床,37 ℃、150 r/min 培养 3 d(其间培养 36 h 时更换微需氧产气袋),收集菌液,同时吸取部分菌液于无抗生素的哥伦比亚血琼脂平板上培养,鉴定有无污染。

1.2.3 *H. pylori* 鉴定 (1)菌落形态鉴定:培养第 3 天时观察菌落形态。(2)革兰染色镜检:滴 1 滴生理盐水于洁净的载玻片上,用接种环刮取少许菌落在生理盐水中涂开(液体培养离心后再进行涂片),将涂片烘干后进行常规革兰染色,于显微镜下观察,呈紫红色为革兰染色阴性。(3)尿素酶试验:刮取细菌涂抹在尿素酶试纸上,在接触部位出现红色反应即为阳性。(4)氧化酶试验:刮取细菌涂抹在氧化酶试纸上,在接触部位出现蓝或黑色反

应为阳性。(5)触酶试验:在 1 张载玻片上滴加 1 滴 5% 过氧化氢溶液,刮取些许细菌置入后,有连续的气泡生成即为阳性。

2 结果

2.1 *H. pylori* 生长状况

固体培养第 3 天时,细菌生长良好,哥伦比亚血琼脂平板上见透明、针尖样菌落生长(见图 1)。液体培养第 3 天时可见培养基明显浑浊,第 3 天培养结束时,涂抹少量菌液于无抗生素的哥伦比亚血琼脂平板培养,肉眼未见污染菌生长,并有透明、针尖样的菌落长出。

2.2 *H. pylori* 形态

革兰染色后,在显微镜下见固体培养的 *H. pylori* 为螺旋状、海鸥状、S 状弯曲菌或短杆菌;液体培养的 *H. pylori* 则多为螺旋短杆状、亦见部分长丝状细菌,有的互相缠绕聚集成团,有的散在分布(图 2)。

2.3 尿素酶、氧化酶及触酶试验结果

取固体或者液体培养的 *H. pylori* 菌进行尿素酶、氧化酶及触酶试验,结果均显示为阳性,尿素酶试纸变为红色,氧化酶试纸变为蓝黑色;触酶试验时,将细菌涂抹在 5% 过氧化氢溶液中时,立即产生大量气泡(图 3)。

3 讨论

H. pylori 是一种挑剔的微需氧菌,它在空气中、无氧条件下都无法生长,只有在含 5% ~ 6% O_2 、8% ~ 10% CO_2 , 85% N_2 的气体环境中才能生长较好^[12-14],实验室通常使用抽换气法和微需氧产气袋法为 *H. pylori* 的生长创造适宜的气体环境。目前,关于 *H. pylori* 的固体培养方法已相对成熟,而液体培养方法因其苛刻的气体条件而受到了极大的限制^[15],目前国内已经报道的液体培养法不多,且方法复杂,如史全泰^[16]、童文德等^[17]研究中液体培养使用的抽换气法,所用的抽换气设备一般实验室较难获得,而如王琼等^[18]所用微需氧产气袋法,操作简单,购买后可直接使用,而且本课题组前期使用的固体法培养的 *H. pylori* 效果良好,故选用微需氧产气袋法进行本次研究。

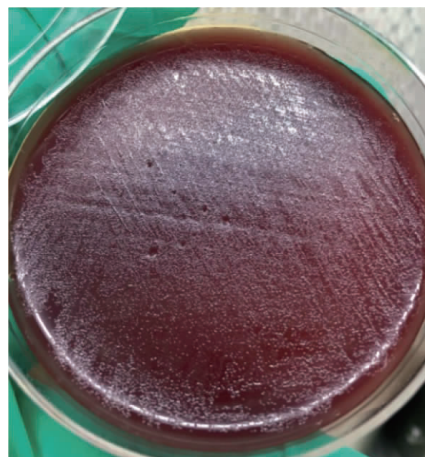


图 1 固体培养第 3 天时的 *H. pylori* 菌落
Fig. 1 *H. pylori* colonies on solid culture medium on the 3rd day of culture

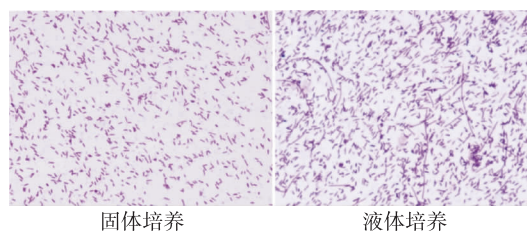
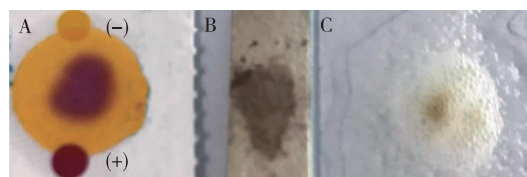


图 2 显微镜下 *H. pylori* 形态(革兰, ×200)
Fig. 2 *H. pylori* morphology from both solid and liquid culture



注:A 为尿素酶,B 为氧化酶,C 为触酶
图 3 *H. pylori* 尿素酶、氧化酶及触酶试验结果
Fig. 3 Enzyme test results for *H. pylori* identification

本研究与郭刚等^[19]的研究类似,选取脑心浸液作为基础液体培养基,加入 10% 的胎牛血清,为 *H. pylori* 提供必要的营养成分,但将其使用的抗生素换为目前已在培养 *H. pylori* 时使用成熟的 *H. pylori* 选择剂(SR0147E),有效的排除了杂菌的污染。此外,本研究对实验材料也进行了改进,选用的实验器材 T25 细胞培养瓶、微需氧罐、微需氧产气袋、空气摇床在实验室均较为容易获得,而且费用相对便宜,使 *H. pylori* 液体培养简单可行。

最终课题组综合国内外文献报道的方法与课题组的前期摸索,将 10 mL 液体培养基装入 T25 细胞培养瓶,竖直放入微氧气罐,加入微需氧产气袋,这样气体就能充分弥散于液体中,较好地为 *H. pylori* 的生长提供适宜的培养环境,再经 37℃,150 r/min 振荡培养 3 d 后鉴定,培养效果良好。

本研究中液体培养出的 *H. pylori* 除了典型的 *H. pylori* 形态外,还出现了少量长丝状菌体,后经固体培养基传代,其性状能保存至少两代。且本课题组成员分别用固体培养和液体培养后的 *H. pylori* 感染胃癌细胞株 AGS 后,检测其上清中白细胞介素 8(IL-8)的含量,发现液体培养的 *H. pylori* 感染胃癌细胞株 AGS 的 IL-8 的含量高于固体培养方法,表明液体培养的 *H. pylori* 体外感染活力较固体培养强^[20]。更进一步说明本方法切实,可行,培养出的 *H. pylori* 能够满足基本科研需求。目前,越来越多的研究关注到 *H. pylori* 的疫苗的研发,其中很多成分的制备均需要通过液体培养 *H. pylori* 来获得。本方法尚只能于少量培养,若进行大批量 *H. pylori* 液体培养尚需进一步的研究和改进。

综上,本研究在综合国内外研究的基础上,建立了一种简便、有效的 *H. pylori* 液体培养方法,该法所使用的实验器材在一般实验室就能满足,而且费用便宜,可以进行广泛应用。

4 参考文献

- [1] MARSHALL B J, WARREN J R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. [J]. *Lancet*, 1984, 1(8390): 1311.
- [2] TATEMATSU M, TSUKAMOTO T, MIZOSHITA T. Role of helicobacter pylori in gastric carcinogenesis; the origin of gastric cancers and heterotopic proliferative glands in mongolian gerbils[J]. *Helicobacter*, 2005, 10(2): 97–106.
- [3] WANG F, MENG W, WANG B, et al. Helicobacter pylori-induced gastric inflammation and gastric cancer[J]. *Cancer Letters*, 2014, 345(2): 196–202.
- [4] MURRAYSTEWART T, SIERRA J C, PIAZUELO M B, et al. Epigenetic silencing of miR-124 prevents spermine oxidase regulation: Implications for Helicobacter pylori-induced gastric cancer [J]. *Oncogene*, 2016, 35(42): 2945.
- [5] ATHERTON J C, BLASER M J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans; ancient history, modern implications[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(9): 2475.
- [6] MCCOLL K E L. Helicobacter pylori: Clinical aspects[J]. *Journal of Infection*, 1997, 34(1): 7.
- [7] SALAMA N R, HARTUNG M L, MULLER A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(6): 385–399.
- [8] HUNT RH, MALFERTHEINER P, YEOMANS ND, et al. Critical issues in the pathophysiology and management of peptic ulcer disease [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1995, 7(7): 685–699.
- [9] 王欢, 毕红燕, 潘科, 等. 幽门螺杆菌多重耐药株 *hefA* 基因表达的检测与分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(5): 393–396.
- [10] 孙辉, 杜东龙, 张莹, 等. 幽门螺杆菌感染对 LAIR-1 影响的实验研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(8): 689–692.
- [11] 谢献胜, 王锋, 陆桂平, 等. 幽门螺杆菌的培养与保存[J]. *泰州职业技术学院学报*, 2006, 6(1): 51–53.
- [12] HAZELL S L. Cultural techniques for the growth and isolation. *Helicobacter pylori: biology and clinical practice* [M] Florida: CRC Press, 1993: 273–284.
- [13] BURY-MONÉ S. Is Helicobacter pylori, a True Microaerophile[J]. *Helicobacter*, 2006, 11(4): 296–303.
- [14] KELLY D J. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(S6): 16–24.
- [15] NDIP RN, MACKAY WG, FARTHING MJ, Weaver LT. Culturing Helicobacter pylori from clinical specimens: review of microbiologic methods. [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003, (36): 616–622.
- [16] 史全泰. 一种改良幽门螺杆菌液体培养方法[J]. *实用医技杂志*, 2005, 12(1b): 176–177.
- [17] 童文德, 曾浩, 邹全明. 幽门螺杆菌液体培养工艺的研究[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(4): 34–37.
- [18] 王琼, 陈峥宏, 杨杰, 等. 胃黏膜中球形幽门螺杆菌的鉴定与临床意义[J]. *贵州医科大学学报*, 2017, 42(1): 31–35.
- [19] 郭刚, 邹全明, 张卫军, 等. 一种改良幽门螺杆菌液体培养方法[J]. *第三军医大学学报*, 1999, (02): 54–56.
- [20] 李雅洁, 周建奖, 赵艳, 等. 不同培养条件对幽门螺杆菌体外感染活力的影响[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(9): 833–836.

(2017-11-25 收稿, 2018-01-31 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 苏晓庆