

幽门螺杆菌临床菌株的分离培养和鉴定*

刘正美**, 周建奖, 赵艳, 熊林, 龙妮娅, 谢渊***

(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: 建立一种幽门螺杆菌(*H. pylori*)临床菌株的分离培养的方法。方法: 取临床胃黏膜组织标本88株, 接种于10%绵羊全血的哥伦比亚选择性培养基上, 37℃、5% O₂、10% CO₂、85% N₂培养3~5 d后, 挑取血平板上透明细小可疑菌落进行革兰氏染色和尿素酶试验, 对阳性菌落进行扩大纯培养, 提取细菌DNA, PCR扩增*H. pylori* 16sRNA、*CagA*基因, 电泳并进行测序鉴定。结果: 成功从临床胃黏膜组织中分离培养出*H. pylori*, 88例胃黏膜组织标本中分离培养并鉴定出*H. pylori* 19株, 阳性率为22%; 对16sRNA及*CagA*基因进行扩增, 电泳可见目的条带, 并对16sRNA扩增产物测序, 与*H. pylori*国际标准菌株26695比对, 同源性为95%~99%。结论: 37℃、5% O₂、10% CO₂、85% N₂条件下10%绵羊全血的哥伦比亚选择性培养基上能成功分离培养出*H. pylori*临床株。

[关键词] 幽门螺杆菌; 分离培养; 临床菌株; 革兰染色; *CagA*基因

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)04-0402-05

Isolation and Culture and Identification of Clinical Strains of *Helicobacter pylori*

LIU Zhengmei, ZHOU Jianjiang, ZHAO Yan, XIONG Lin, LONG Niya, XIE Yuan

(Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and culture the clinical strains of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) from patients in the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, and to master the methods of isolation, culture and identification of clinical isolates. **Methods:** 88 samples of specimens were collected from clinical gastric mucosal tissue and inoculated on columbia selective medium with 10% sheep blood, then cultured on the condition of 37℃, 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ for 3~5 days. The transparent small suspicious colonies on blood agar were picked out to undergo Gram staining and rapid urease test. The positive colonies were expanded by pure culture. DNA of bacterial was extracted and 16sRNA of *H. Pylori* was amplified by PCR. Electrophoresis and sequencing were conducted for identification. **Results:** 19 strains of *H. Pylori* from 88 samples of specimens collected from clinical gastric mucosal tissue were successfully isolated, cultured and identified. The positive rate was 22%. 16sRNA and *CagA* of *H. Pylori* were amplified by PCR and their electrophoresis strips were clearly visible. The sequenced 16sRNA amplification products were compared with *H. pylori* international standard strain 26695, and their homology was 95%~99%. **Conclusion:** *H. pylori* clinical strains are successfully isolated and cultured, and the method of isolation, culture and identification of *H. pylori* clinical isolates was skillfully mastered.

[Key words] *Helicobacter pylori*; isolation and culture; clinical strains; Gram stain; *CagA* gene

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种呈螺旋状或S形、微需氧的革兰氏阴性杆菌,由

澳大利亚科学家 Mashall 和 Warren 于1983年从慢性胃炎病人的胃黏膜中首次分离并成功培养^[1-2]。

*[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81260303)

** 贵州医科大学2013级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: xieyuan1974@163.com

网络出版时间: 2016-04-20 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160420.1808.020.html>

H. pylori 是全球最常见的感染性病原菌之一,是慢性胃炎、胃溃疡的主要致病因素^[3-4],与胃癌的发生发展密切相关^[5]。近年来的许多研究发现,*H. pylori* 感染与心血管疾病、血液系统疾病、皮肤疾病以及口腔疾病等的发生密切相关^[6-8]。目前流行病学研究显示,发达国家 *H. pylori* 的感染率为 30%~50%,中国作为人口众多的发展中国家,是 *H. pylori* 的高感染区,*H. pylori* 感染率高达 40%~90%,平均为 59%^[9]。*H. pylori* 临床菌株的分离培养是诊断 *H. pylori* 感染的“金标准”^[10-11],亦是 *H. pylori* 基础及临床研究的一项基本技术。成功分离培养的临床菌株可用于细菌分型、致病机制研究、构建动物模型及确定致病因子等基础研究^[12]。随着 *H. pylori* 耐药菌株的日益增加,培养 *H. pylori* 还能提供细菌耐药性的资料,这对指导临床用药极为重要。本文旨建立一种从临床胃黏膜组织中分离培养出 *H. pylori* 培养和鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

在病人知情同意的原则下,从胃镜中心收取 2014-2015 年就诊患者 88 例的胃黏膜组织标本,其中男 42 例,女 46 例,年龄为 26~71 岁。微需氧培养罐及微需氧产气袋(850 mL/L N₂, 100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂)购自 Mitsubishi, Japan。恒温培养箱,一次性接种环,哥伦比亚琼脂(OXOID,英国),幽门螺杆菌选择剂(OXOID,英国),布氏肉汤,革兰氏染液(安徽巢湖弘慈医疗公司),尿素酶试纸(广东珠海克迪科技公司),超净工作台;脱纤维绵羊全血(友康生物科技有限公司,北京)。

1.2 方法

1.2.1 *H. pylori* 运送液、冻存液以及哥伦比亚血琼脂平板的配制 *H. pylori* 运送液:称取改良布氏肉汤粉末 2.81 g,加热搅拌溶解于 100 mL 蒸馏水中,分装三角瓶,121 °C 高压灭菌,冷却后无菌分装 200 μL/管,再于每管内加入 2.5 μL *H. pylori* 选择剂,置于 4 °C 冰箱。*H. pylori* 冻存液的配制:配制 10% 蔗糖溶液,高压灭菌后,与胎牛血清按 1:1 比例进行配制。哥伦比亚血琼脂平板:称取哥伦比亚琼脂 3.9 g,加入双蒸水 90 mL,121 °C 高压灭菌,冷却至 50 °C 左右时,于超净工作台加入 10 mL 脱纤维绵羊全血,0.4 mL *H. pylori* 选择剂,混匀后倒入平板。

1.2.2 标本采集和转运 胃镜下于胃窦部用无菌活检钳(用 750 mL/L 乙醇火烧灭菌,冷却处理)

取黏膜组织,将组织取下置于装有 0.3 mL *H. pylori* 运送液的 EPP 管中,4 °C 2 h 内送于分子生物重点实验室进行分离。

1.2.3 标本接种与培养 在超净工作台内,将组织用高压灭菌的组织剪剪碎,机械研磨 60 s,将其全部倒入已铺制好的哥伦比亚血琼脂平板上,用 L 型玻璃棒涂抹开,将接种好的血平板置于放有产气袋的厌氧罐内或三气培养箱(5% O₂、10% CO₂、85% N₂) 37 °C 培养 3~5 d。

1.2.4 *H. pylori* 鉴定 (1) 革兰氏染色,取一环生理盐水置于洁净的载玻片上,挑取血平板上透明细小可疑菌落于生理盐水上涂开,待干后,于酒精灯上固定,结晶紫初染 1 min,碘液媒染 1 min,酒精脱色 30 s,复红复染 30 s,显微镜下观察,见革兰氏染色阴性的细小、弯曲状杆菌为 *H. pylori* 阳性。(2) 尿素酶试验,挑取血平板上透明细小可疑菌落致尿素酶试纸上,1 min 后试纸由黄色变为红色则为 *H. pylori* 阳性。(3) *H. pylori* 阳性菌落 16sRNA 鉴定,对 *H. pylori* 阳性菌落进行传代扩大培养,提取细菌 DNA,设计 *H. pylori* 16sRNA 引物(上游引物 5'-CTT GCT AGA GTG CTG ATTA-3',下游引物 5'-TCC CAC ACT CTA GAA TAGT -3')进行 PCR 扩增,扩增条件为 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 25 个循环, 72 °C 7 min, 4 °C 保温,目的条带为 550 bp。PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,若有目的条带,则将扩增产物纯化后测序,将测序结果与 *H. pylori* 国际标准株 26695 进行序列比对。(4) *H. pylori* 阳性菌落 *CagA* 鉴定,对 *H. pylori* 阳性菌落进行传代扩大培养,提取细菌 DNA,设计 *CagA* 引物(上游引物 5'-ACA ATGA CTA ACG AAA CCA-3',下游引物 5'-TTT TGG TAT TCC TTA TCC T-3')进行 PCR 扩增,扩增条件为 95 °C 5 min, 98 °C 60 s, 55 °C 15 s, 72 °C 4 min 25 个循环, 72 °C 10 min, 4 °C 保温,目的条带为 3 500 bp。PCR 产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,若有目的条带,则将扩增产物纯化后测序。(5) *H. pylori* 菌株的冻存,扩大培养经鉴定的 *H. pylori* 菌株,将细菌用接种环刮取放置在 2 mL 冻存管(500 uL 冻存液)中,每管置入 2~3 环细菌。迅速放置于 -80 °C 冰箱中,过夜后转入液氮罐长期保存。

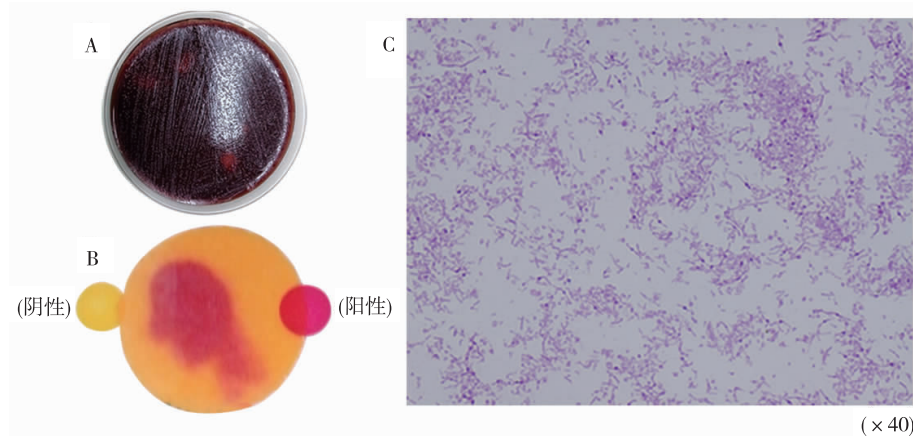
2 结果

2.1 *H. pylori* 阳性率

本研究从临床所取 88 例组织标本中分离培养

并鉴定出 *H. pylori* 阳性菌 19 株,阳性率为 22%。*H. pylori* 在哥伦比亚血琼脂培养基上微需氧培养 3 d 后呈灰白色针尖样菌落(图 1A),尿素酶试验

为阳性(图 1B);经革兰氏染色后在显微镜下观察可见革兰阴性(紫红色)的细小、弯曲状、螺旋状杆菌(图 1C);



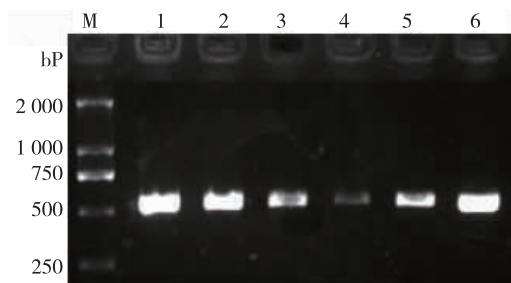
注:A 为 *H. pylori* 在哥伦比亚血琼脂培养基上微需氧培养 3 d 后呈灰白色针尖样菌落,
B 为尿素酶试验阳性,C 为 *H. pylori* 经革兰染色后在显微镜下表现

图 1 *H. pylori* 菌落、尿素酶试验及革兰氏染色

Fig. 1 *H. pylori* colony, urease test and the microscopic morphology of gram staining

2.2 *H. pylori* 阳性菌落 16sRNA 鉴定

对 *H. pylori* 的 16sRNA 基因进行扩增,约在 550 bp 处可见目的条带(图 2),并对扩增产物测序,与 *H. pylori* 国际标准菌株 26695 比对,同源性和 95% ~ 99%(图 3)。



注:M 为 DNA Marker(DL2000),1 为标准菌株 26695,
2 ~ 6 为分离培养的 *H. pylori* 菌株

图 2 *H. pylori*16sRNA 基因 PCR 扩增产物
Fig. 2 Electrophoresis map of PCR products
of 16sRNA of *H. pylori*

2.3 *H. pylori* 阳性菌落 *CagA* 鉴定

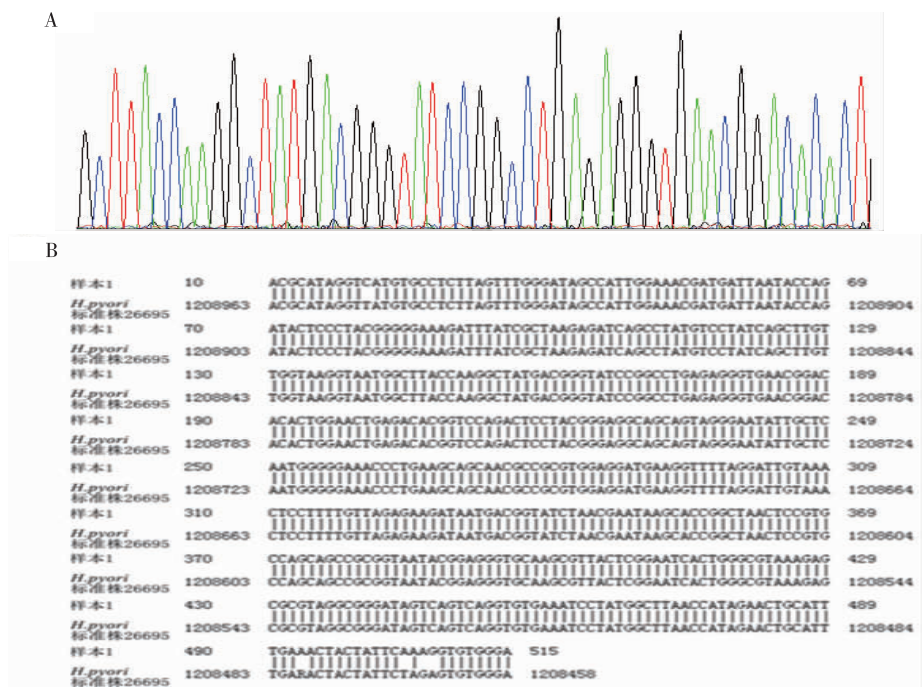
对 *H. pylori* 的 *cagA* 基因进行扩增,约在 3 500 bp 处可见目的条带(图 4),并对扩增产物测序(图 5)。

3 讨论

H. pylori 对营养条件要求较高,一般培养条件很难生长,要求与体内胃黏膜下层条件相似,即微

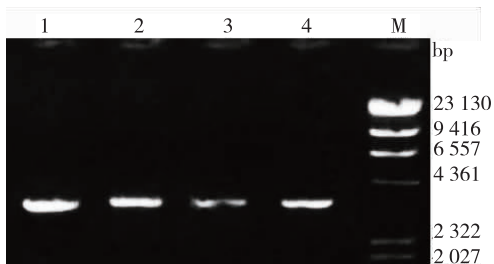
需氧(5% O_2)环境,37 ℃,湿度达 98% 以上。目前,*H. pylori* 培养多采用固体培养基,常用的有脑心浸液琼脂、布氏琼脂、哥伦比亚琼脂等。本次 *H. pylori* 临床菌株的分离培养采用的培养基为哥伦比亚琼脂培养基,于病人胃窦部取材后,将组织剪碎涂抹于已配置好的哥伦比亚血琼脂平板上,前期有 36 株于厌氧罐内,放入产气袋进行培养,后 52 株培养于三气培养箱内,结果发现于三气培养箱内的 *H. pylori* 生长较好。众多研究培养 *H. pylori* 采用的哥伦比亚固体培养基,其中常加入 10% 的胎牛血清,本研究加入的是 10% 的脱纤维绵羊全血,营养更充分,且后期纯培养时均采用三气培养箱进行培养,培养条件较稳定,利于 *H. pylori* 的生长。

本研究分离培养 88 株临床组织标本,阳性株有 19 株,其阳性率为 22%。且 *H. pylori* 临床菌株的培养阳性率与入选病人性别、年龄无关。这与国内外报道的 *H. pylori* 临床菌株培养阳性率相比明显较低。针对 *H. pylori* 分离阳性率较低,可能存在以下原因:(1)钳取患者胃组织标本未能及时放入运送液,转运时间太长;正常情况下将组织分离后转运至实验室分离培养的时间一般不超过 3 ~ 4 h,转运时间太长或温度过高会导致细菌死亡;(2)在接种菌的过程中暴露在空气中时间过长,导致分离阳性率降低;(3)实验前期在普通实验操作台分离 *H. pylori*,导致杂菌污染而致 *H. pylori* 分离失败,之



注:A 为分离培养所得的 *H. pylori* 菌株的测序峰图,B 为与国际标准株 26695 的比对结果
图 3 分离培养所得的 *H. pylori* 菌株的测序峰图及与标准株 26695 的比对结果

Fig. 3 Sequencing map of sample and the blast result compared to international standard 26695 strain



注:M 为 PNA Marker,1~4 为分离培养菌株
图 4 *H. pylori* *cagA* 基因 PCR 扩增产物
Fig. 4 Electrophoresis map of PCR products of *H. pylori* CagA gene

后在超净工作台分离,于三气培养箱中培养,阳性率略提高;(4)钳取胃组织的部位也存在 *H. pylori* 分布的差异,有文献报道称,*H. pylori* 多寄生在胃窦部,但在宿主因素和环境因素的共同作用下,极有可能向胃底部及贲门部移行,因此钳取的胃窦部标本可能不存在 *H. pylori* 感染或数量极少,不能分离到 *H. pylori*,导致阳性率低^[13]。

H. pylori 的最佳培养时限是 3 d,此时菌落的肉眼形态与镜下菌体形态均很典型,细菌处于对数生长期,可以进行传代、保存或药物敏感性试验等研究^[14]。本次分离培养 *H. pylori* 临床株也证实了

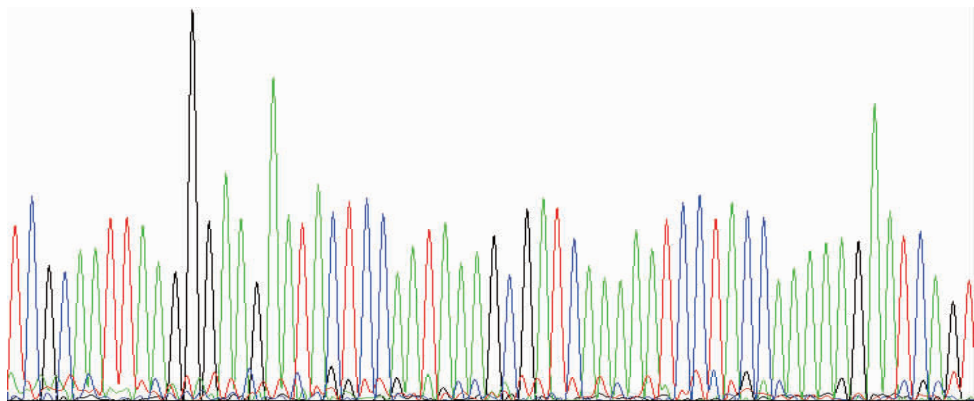


图 5 *cagA* 基因部分序列峰
Fig. 5 The partial sequencing diagram of *CagA*

这一点,传代培养 3 d 的 *H. pylori* 平板上菌落形态典型,经革兰氏染色后镜下可见呈 S 形、螺旋状,培养约 5 d 后经革兰氏染色后镜下可见细菌开始球形变,呈短杆状,延长培养至 7 d 时,此时可能由于培养基营养成分缺失等原因,*H. pylori* 形态呈球形变,且低温保存后难以复苏成功。所以,本研究把纯培养后生长良好 *H. pylori* 菌落保存于小牛血清和蔗糖的等体积混合液中, - 80 ℃ 过夜保存后转入液氮长期保存,其复苏成功率较高,说明该方法可以很好地用于 *H. pylori* 临床菌株的保存。

4 参考文献

- [1] Warren JR, Barry M. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis [J]. Lancet, 1983(8336): 1273 - 1275.
- [2] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. Lancet, 1984(8390): 1311 - 1315.
- [3] Zhang L, Wang P, Wei SL, et al. Advances in relationship between gastric disease and polymorphisms in both helicobacter pylori virulence factors and host genetics [J]. Hereditas, 2011(6): 558 - 566.
- [4] Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma [J]. Am J Gastroenterol, 2003(5): 975 - 986.
- [5] Furuta Y, Yahara K, Hatakeyama M, et al. Evolution of *cagA* oncogene of *Helicobacter pylori* through Recombination [J]. PLoS ONE, 2011(6): 1 - 11.
- [6] Izzotti A, Durando P, Ansaldi F, et al. Interaction between *Helicobacter pylori*, diet, and genetic polymorphisms as related to non-cancer diseases [J]. Mutat Res, 2009(667): 142 - 157.
- [7] Isomoto H, Kawazoe K, Inoue K, et al. Usefulness of the immunological rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* in patients who are reluctant to undergo endoscopic biopsies [J]. Dig Dis Sci, 2006(51): 2302 - 2305.
- [8] Yang CS, Cao SY. Study of correlation between *Helicobacter pylori* infection and hyperammonemia and hepatic encephalopathy in cirrhotic patients [J]. Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue, 2007(19): 422 - 424.
- [9] 胡伏莲. 中国幽门螺旋杆菌研究现状 [J]. 胃肠病学, 2007(9): 516 - 518.
- [10] Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy [J]. World J Gastroenterol, 2009(15): 1528 - 1529.
- [11] Koido S, Odahara S, Mitsunaga M, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: comparison with gold standard [J]. Rinsho Byori, 2008(56): 1007 - 1013.
- [12] Schreiber S, Buecker R, Groll C, et al. Rapid loss of motility of *Helicobacter pylori* in the gastric lumen in vivo [J]. Infect Immun, 2005(73): 1584 - 1589.
- [13] 吴友山, 李秀青. 不同部位胃癌 Hp 感染的比较 [J]. 山西医科大学学报, 2009(11): 1011 - 1013.
- [14] 郝庆. 幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的分子基础 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2002.

(2016-01-07 收稿, 2016-03-22 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 刘 华

科技论文写作技巧

题名 题名是一篇论文的总题目,也称总标题、篇名或文题。题名的作用有二:(1)作为一篇论文的总名称,应能展现论文的中心内容和重要论点,使读者能从题名中了解到该文所要研究的核心内容和主要观点;(2)提供给二次文献机构、数据库系统检索和收录,题名应尽可能包含有主题词和关键词,以供标引者选用和读者检索之用。题名的要求:(1)题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要、特定的内容,要符合编制题录、索引和检索的有关原则,并有助于选定关键词;(2)中文题名一般不宜超过 20 个字,必要时可加副标题;(3)英文题名应与中文题名含义一致,一般以不超过 10 个实词为宜;(4)题名应避免使用非公和公用的缩写词、字符、代号,昼不出现数学式和化学式。

《贵阳医学院学报》编辑部