

# 幽门螺旋菌的长期保藏

王正祥

(江苏省扬州医学院微生物学教研室)

**摘要** 常规方法保藏幽门螺旋菌极为困难。将该菌新鲜培养物接入补加小牛血清及甘油的布氏肉汤中,于  $-70^{\circ}\text{C}$  保藏,可安全保藏 5—13 个月。

**关键词** 幽门螺旋菌;长期保藏

幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) 感染与胃炎及消化道溃疡密切相关<sup>[1-3]</sup>。研究此菌生物学特征对加深认识及指导临床治疗极有意义。然而幽门螺旋菌保藏极为困难<sup>[4]</sup>,在补加甘油的肉汤中保藏期仍很短,  $4^{\circ}\text{C}$  最多可存活 17 天<sup>[5]</sup>,对冻融极敏感。为此,作者建立起一种可靠的、可长期保藏幽门螺旋菌的方法。

## 材料与方 法

### (一) 微生物菌株

幽门螺旋菌标准菌株由张振华教授惠赠,其余试验菌株 YC<sub>1</sub>—YC<sub>9</sub> 是作者从胃粘膜活检组织中分离到的<sup>[6]</sup>。

### (二) 培养基及培养

培养幽门螺旋菌用 Skirrow 培养基: 在布氏肉汤中补加 10% 小牛血清、2% 琼脂及 1% 混合抗生素(抗生素混合液: 600 mg/L 万古霉素, 200 mg/L 多粘菌素 B, 500 mg/L TMP)。

幽门螺旋菌的分离培养是在 5.1% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 微氧培养箱 (Forma 公司出品) 中进行。

### (三) 保藏培养基

布氏肉汤补加 10% 小牛血清和 10% 甘油。

### (四) 保藏及复苏方法

取培养 48 小时的幽门螺旋菌新鲜菌苔二环,置 3 ml 保藏培养基中,混匀后封口,立即置  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中存放。复苏时,将取出的保藏菌株立即置  $37^{\circ}\text{C}$  水浴中融化,离心去大部分保藏培养基,然后打散沉积,涂布 Skirrow 平板,于微氧环境中培养。

## 结果与讨论

经此法保藏的 10 株幽门螺旋菌,保存时间平均为 8 个月,最长为 13 个月 (2 株),最短为 5 个月 (1 株),全部存活。其生化特性: 尿素酶试验、氧化酶试验、触酶试验和马尿酸盐水解试验的结果,涂片革兰氏染色结果,及相差显微镜下的形态均与原菌株的生物学特征完全一致。据 Drumm 及 Sherman<sup>[7]</sup> 最近研究认为,幽门螺旋菌在补加小牛血清的布氏肉汤中培养 24 小时后,再补加 10% 小牛血清及 10% 甘油,并立即置  $-70^{\circ}\text{C}$  存放,保存期可达 6 个月以上;如果保藏前不作 24 小时增菌培养,则  $-70^{\circ}\text{C}$  下仅能保藏 1 个月。作者在实验中发现,幽门螺旋菌在液体培养基中生长极为缓慢,

(下转封二)

试管中 24 小时增殖对细胞数的影响不很大,故认为保藏前增殖似无必要。用此法还对阳性胃粘膜标本直接保藏, 4 个月后仍能分离出幽门螺旋菌。由此看来, 本法用于幽门螺旋菌纯种及胃粘膜标本中幽门螺旋菌的长期保藏是可行的。

1. Warren JR & BJ Marshall: *Lancet*, **1**: 1273, 1983。
2. Blaser MJ: *Gastroenterol*, **93**: 371, 1987。
3. 张振华等: 中华消化杂志, **5**:231, 1985。
4. Westblom Tu et al.: *J Clin Pathol*, **40**: 353, 1987。
5. 陈晶晶等: 中国微生物学杂志, **2**(3):15, 1990。
6. 王正祥等: 扬州医学院学报, **2**(2):47, 1990。
7. Drumm B & P Sherman: *J Clin Microbid*, **27**: 1655, 1989。