

幽门螺杆菌液体培养工艺的研究*

童文德 曾浩 邹全明**

(中国人民解放军第三军医大学临床微生物学教研室 重庆 400038)

摘要: Hp 的液体培养尤其是大规模培养仍存在许多问题。通过单因子试验统计分析, 优化筛选了适于幽门螺杆菌的液体培养基和摇瓶培养条件。结果表明, 在适宜的摇瓶培养条件下, Hp 能够在添加 β -环糊精 (β -Cyclodextrin, β -CD) 的布氏肉汤中很好地生长, 菌体收获量达到 0.6g/mL。

关键词: 幽门螺杆菌, 液体培养, 单因子试验

中图分类号: R378.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0034-04

STUDIES ON LIQUID STATE CULTURE CONDITIONS OF *HELICOBACTER PYLORI*

TONG Wen-De ZENG Hao ZOU Quan-Ming

(Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract: There are still many problems at liquid state culture especially large-scale culture for *Helicobacter pylori* at present. Using analytical technique of single factor test statistics, a suitable medium and shaking culture conditions for *Helicobacter pylori* have been selected. The experimental results showed: under the optimal shaking culture conditions Hp could be grewed well enough in Brucella broth with β -CD. The thalli weight reached 0.6g/100mL.

Key words: *Helicobacter pylori*, Liquid state culture, Single factor test

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 已被公认为是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因, 并且与胃癌的发生密切相关。Hp 疫苗的研究是预防和治疗幽门螺杆菌感染的发展方向。而采用液体发酵技术大规模生产 Hp 菌体则是疫苗研究的基础。但 Hp 发酵培养存在一些问题: 成分复杂、配制较烦琐、影响因素多, 尤其是培养基成分中蛋白含量高, 对后期的 Hp 菌体抗原纯化带来了很大难度。因此, 选用适宜的 Hp 液体培养基以满足大规模的 Hp 发酵培养及下游的抗原纯化工作是关键, 为此, 我们采用单因子试验统计分析技术对 Hp 液体培养基和培养条件进行了优化筛选, 以期能为 Hp 的液体深层发酵培养提供可靠的工艺路线和参数。

1 材料与方 法

1.1 菌种

HpATCC11637、ATCC11639 标准菌株: 由中国流行病学研究所惠赠。

Hp9882、Hp9883 菌株: 由我室从临床胃病患者的胃镜活检组织分离培养所得, 经染色、脲酶、触酶、氧化酶试验及 PCR 鉴定。液氮保存。

1.2 培养基

种子菌培养基: 脑心浸液血琼脂平板, 布氏肉汤; 蛋白胨 10g, 胰蛋白胨 10g,

* 国家“九五”重点科技攻关计划课题 (No. 96-901-01-54)

** 联系人 Tel: 023-68752316, Fax: 023-68752316, E-mail: qmzou@vail.tmmll.com.cn

收稿日期: 2001-04-23, 修回日期: 2001-12-09

NaCl 5g, Na_2HPO_4 2.5g; 脑心浸液肉汤: 脑心浸液 1000mL, 蛋白胨 108g, NaCl 5g, Na_2HPO_4 2.5g; M·H 肉汤: 牛肉浸汤 1000mL, 酪蛋白水解物 17.5g, 可溶性淀粉 1.5g。

以上培养基中均加入 Hp Skirrow 选择性抗生素 30mg/100mL。(万古霉素 10mg/100mL、TMP 5mg/100mL、多粘菌素 B 10mg/100mL、萘啶酸 5mg/100mL)。

1.3 添加成分

小牛血清(由我室制备, -4°C 冷冻保存); 0.15% 化学纯复合氨基酸(参照文献配制^[1]); 0.2g/100mL β -CD(上海化学试剂公司)。

1.4 培养方法

300mL 摇瓶装入 100mL 培养基, 接入 5mL 浓度为 10^8 CFU/L 的菌悬液作为种子菌, 瓶口轻塞上无菌棉塞, 水平放入玻璃厌氧罐, 并通过抽气换气法建立微需氧环境(80% N_2 、10% CO_2 、5% O_2 、5% H_2), 固定于 HZQ-Q 旋转式恒温摇床(哈尔滨)内于 37°C 、200r/min 下培养 24h。

1.5 检测方法

pH 测定: 用 MP120 智能型 pH 计(CE, 英国)测定。

A 值测定: 以同种培养条件下未加 Hp 的液体培养基作为空白对照, 在 721 分光光度计(上海光学仪器厂) 600nm 波长下测定其吸光度值。

菌体湿重测定: TGL16G 高速冷冻离心机(Beckman, 美国) 4°C 、5000r/min 收获菌体, 生理盐水洗 3 次后离心称重。

2 结果与分析

2.1 液体培养基的优化

2.1.1 菌株及基础培养基的筛选: 在相同条件下, 将 4 株 Hp 菌株分别接种于 3 种培养基中培养 24h, 结果见表 1。

表 1 不同菌株在 3 种培养基中的产量 (g/100mL)

	Hp11637	Hp11639	Hp9882	Hp9883
布氏肉汤	0.584	0.511	0.503	0.482
脑心浸液肉汤	0.563	0.540	0.473	0.458
M·H 肉汤	0.352	0.316	0.287	0.224

从表 1 中看出, Hp11637 菌株在 3 种培养基中的产量均优于其它 3 个菌株, 为优选菌株。

3 组培养基以布氏肉汤和脑心浸液肉汤生长较好, 但由于脑心浸液肉汤中蛋白量较大, 菌体纯度不高, 同时考虑到成本、来源等诸因素, 选择布氏肉汤作为基础培养基为宜。

2.1.2 添加物的筛选: 在布氏肉汤基础培养基中分别加入 10% 小牛血清、10% 复合氨基酸、0.2g/100mL β -CD、接种 10^8 CFU/L 浓度的 Hp11637 菌悬液同时进行培养(图 1)。

从图 1 中可以看出, 3 种添加物均可促进 Hp 的生长, 其中以 β -CD 最佳。涂片行革兰代染色镜检, β -CD 布氏肉汤中的 Hp 形态典型, 视野清亮, Hp 纯度高, 故添加成分以 β -CD 为最佳。

2.1.3 葡萄糖浓度的选择: 作为碳源和能源的基本成分, 葡萄糖浓度的选择对 Hp 的生长至关重要。我们在固定其它因素条件下, 对不同的葡萄糖浓度与菌体量的关系进行了摸索。结果表明,

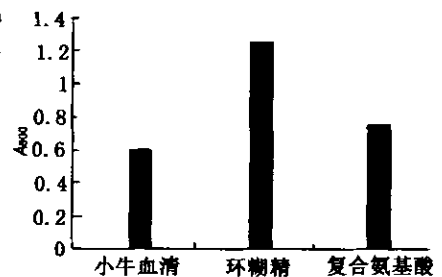


图 1 不同添加物对 Hp 生物的影响

葡萄糖浓度小于0.2g/100mL时,随着浓度的增加,菌体量也增加,但超过0.2g/100mL后菌体量就基本不受葡萄糖浓度的影响了。因此,葡萄糖浓度以0.2g/100mL为好。

综上所述, Hp 适宜的液体培养基组成为:布氏肉汤、0.2g/100mL β-CD、0.2g/100mL 葡萄糖、30mg/100mL skirrow 选择性抗生素。

2.2 摇瓶培养条件试验

以下的摇瓶培养条件试验均采用本培养基组成。

2.2.1 培养基起始 pH 对菌体产量的影响:将培养基用 1.0mol/L HCl 和 1.0mol/L NaOH 调成不同的 pH 值,接种培养后,测菌体湿重,结果表明,在 pH7.5~8.0 时,菌体产量最高,这与文献报道^[2]的 Hp 最适生长 pH 值 8.0±0.5 相近。

2.2.2 摇瓶装量及摇床转速对菌体产量的影响:在 Hp 摇瓶培养中,摇瓶装量与摇床转速密切相关。装量过少,影响菌体产量;装量过高,又限制摇床转速,从而降低了液体与气体接触的表面积,影响 Hp 生长。在综合考虑两方面因素的条件下,我们对不同装量及转速进行了摸索,结果发现,在 300mL 摇瓶中放入 100mL 培养基,于 200r/min 摇床内既可使培养基有较好的利用率,又能使菌体产量更高。

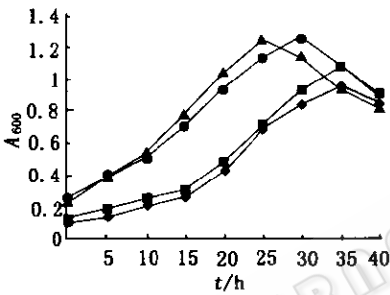


图2 不同接种浓度下 Hp 生长曲线

◆ 10⁶, ■ 10⁷, ▲ 10⁸, ● 10⁹

2.2.3 不同接种量对菌体产量的影响:分别接种于 10⁶、10⁷、10⁸、10⁹ CFU/L 4 种浓度的 Hp 菌悬液于培养基中培养,结果发现,不同的接种浓度有着不同的生长曲线,接种量越大,最大生长量所需的时间越短。当接种浓度为 10⁸ CFU/L 和 10⁹ CFU/L 时,最大菌量分别于 24h 和 30h 后达到,随着接种浓度的降低,最大菌量所需时间相应推迟,当接种浓度为 10⁶ CFU/L 和 10⁷ CFU/L 时,在培养 36h 后才达到最大菌量。结果见图 2。

2.2.4 培养过程中换气对 Hp 生长的影响:接种同等浓度的菌悬液各 5mL 于 2 瓶培养基中,微需氧条件下 37℃ 振荡培养 2d,其中 1 瓶每隔 5h 换气 1 次,另 1 瓶在培养过程中不换气,每 12h 测定其吸光度值,结果显示,培养过程中换气可使 Hp 达最大生长量所需的时间较不换气培养提前 12h,且前者所达到的最大菌量较后者高。可见,气体条件是直接影响 Hp 生长的重要因素,培养过程中定时的换气,可使 Hp 生长过程中不断消耗的 O₂ 和 CO₂ 得到补充,从而加快 Hp 生长速度并促进 Hp 生长。

3 讨论

Hp 是一种营养要求很高的微需氧菌,在一般的培养条件下不能生长。目前,针对 Hp 的固体培养方法已比较成熟,而 Hp 的液体培养尤其是大规模培养的方法仍存在许多问题。我们采用单因子试验统计分析技术,即固定其它条件逐个选择某个因子的最佳条件,最终把每个因子的最佳条件选出组成最优的培养基组成和摇瓶培养条件。结果表明,在适宜的摇瓶培养条件下, Hp 能够在添加 β-CD 的布氏肉汤中很好地生长,菌体收获量达到 0.6g/100mL。这种培养基的优点在于:组成简单、配制方便、价格低廉、菌体产量高,且组成成分中蛋白含量少,有利于后期 Hp 菌体抗原的纯化。

在 Hp 液体培养研究中,选择适宜的添加物是促进 Hp 密集生长的重要因素。研究表明,小牛血清、复合氨基酸、β-环糊精等均可不同程度地促进 Hp 的生长。而其中以

复合氨基酸和 β -环糊精的促进作用更明显,且更适用于大规模的液体培养。但 George L^[3]的研究发现,不同 Hp 菌株对氨基酸的需求不尽相同,即不同 Hp 菌株有各自所需的氨基酸组成,且甘氨酸、赖氨酸等氨基酸对某些 Hp 菌株的生长反而有明显的抑制作用。可见,这种补加复合氨基酸的方法不仅加大了 Hp 液体培养研究的工作量和难度,且不易普及推广。 β -环糊精是淀粉的一种不完全水解产物,它由7个葡萄糖吡喃结构单元组成,形成一种中空的窗格状分子。正是这种特殊的分子构型为 Hp 创造了良好的生长环境。研究表明^[4], β -环糊精可有效促进 Hp 密集生长。我们的实验也证实了这一点。

适宜的培养条件是 Hp 液体培养的重要因素。某一条件的改变常会使 Hp 生长造成显著差异,而种子菌浓度和气体条件是最关键的影响因素。通过实验,得到了 Hp 摇瓶培养较稳定的培养条件,以求能为该工艺的放大试验起到一定的指导作用。

参 考 文 献

- [1] Peter N. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 9: 3450 ~ 3453.
- [2] Donna R, Raymond F, Charles E, et al. Journal of Clinical Microbiology, 1987, 11: 2123 ~ 2125.
- [3] George L, Mendz, Stuart L, et al. Int J Biochem Cell Biol, 1995, 27: 1085 ~ 1093.
- [4] Antonio M, Paola M, Marco A, et al. Arch Microbiol, 1995, 164: 290 ~ 293.