· 实验研究 ·

香港海鸥菌不同保存方法效果比较*

刘优招[1], 冯梅[1], 王丽[1], 陈炜聪[2], 韩宇宇[2], 王祉蕴[3], 陈清[1], 刘志华[4], 胡静[1]

摘　要: 目的　比较不同方法对香港海鸥菌的短期和长期保存效果, 以期建立该菌的简单、实用和经济的短期和长期保存方法。**方法**　采用半固体石蜡封存法, 磁珠菌种保存管、10% 甘油、15% 甘油肉汤和 30% 甘油肉汤等 5 种方法保存香港海鸥菌, 其中, 半固体石蜡封存法的保存温度为室温和 4 ℃, 其他方法均在 −20 ℃和 −80 ℃进行菌种保存。定期进行菌种复苏, 采用活菌菌落计数比较不同方法的保存效果, 观察期为 12 个月。**结果**　半固体石蜡封存法在室温环境下保存的活菌数在 6 个月内呈缓慢下降趋势(活菌数的对数值下降幅度 <1), 但 6 个月以后活菌数急速下降且菌落变小, 至第 9 个月时为 0 CFU/mL; 而 4 ℃保存的第 1 个月活菌数下降幅度小, 但到第 3 个月时活菌数为 0 CFU/mL; 在 12 个月内, 磁株及 3 种不同甘油浓度保存的活菌数在 −80 ℃下保持相对稳定, 但 −20 ℃下保存时间短、效果差。**结论**　室温条件下的半固体石蜡封存法适合短期保存香港海鸥菌, 而 −80 ℃低温条件下的磁株或甘油适合长期保存。

关键词: 香港海鸥菌; 保存; 活菌菌落计数; 甘油

中图分类号: R 181.2+4　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)03-0471-04　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-03-34

Comparison of methods for *Laribacter hongkongensis* strain storage

LIU You-zhao*, FENG Mei, WANG Li, et al (*Department of Epidemiology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province* 510515, China)

Abstract: Objective　To compare different methods for preserving *Laribacter hongkongensis* (LH) strains and to develop a simple and practicable preservation protocol for short- and long-term storage and reactivation LH strain. **Methods**　The five methods for LH strain storage included: (i) semisolid with paraffin storage, (ii) Microbank vial, (iii) 10% glycerol, (iv) 15% glycerol/85% Luria-Bertani (LB) broth culture, and (v) 30% glycerol/70% LB broth culture. The LH strains were put at 4 ℃ and room temperature when using methods i, while the stains were disposed at conventional freezing temperatures of −20 ℃ and −80 ℃ when using other methods, respectively. All storage techniques were evaluated periodically by counting with colony-forming unit over 12 months. **Results**　For semisolid with paraffin storage, the viable strains were reduced gently up to 6 months at room temperature, then reduced rapidly and LH colonies became pinpoint size, contrasting with no colony growth on MacConkey agar at 3-month at 4 ℃. Preservation of LH strains in Microbank vial, 10% glycerol, 15% glycerol broth, and 30% glycerol broth stored at −80 ℃ were proved to be stable for up to 12 months. However, recovery of the strains from these methods stored at −20 ℃ showed poor growth after one month. **Conclusion**　Semisolid with paraffin storage at room temperature is an effective way for short-term preservation of LH strain. Preservation in glycerol or Microbank vial at −80 ℃ is recommended for prolonged periods of LH strain storage.

Key words: *Laribacter hongkongensis*; storage; colony-forming unit; glycerol

香港海鸥菌(*Laribacter hongkongensis*, LH), 于 2001 年在香港一名肝硬化病人的胸腔脓血中分离到并被鉴定为变形菌门(*Proteobaxteria*)、β-变形菌纲(β-subclass *Proteobacteria*)、奈瑟菌科(*Neisseriaceae*)的一个新属[1]。随着对该菌研究的进一步研究发现, 香港海鸥菌不仅可引起人类胃肠炎, 还可能是菌血症或腹膜炎的病原菌之一[2]。但总体而言, 对于该新发现细菌的研究仍处于初级阶段。而关于香港海鸥菌适宜保存方法的研究, 尚无相关报道。简单又有效的保存菌种, 是细菌学研究中最基础的实验室工作。目前, 微生物菌种保存方法主要有斜面保存法、石蜡油封存保存法、真空冷冻干燥法及甘油低温保存法等[3]。其中以真空冷冻干燥法最佳, 但因其需要特定的设备, 较难在一般实验室普及。为确定一种经济、简便和保存效果好的香港海鸥菌的保存方法, 本研究选取 5 种实验室常用的菌株保存方法进行比较。现将结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要培养基与试剂　麦康凯琼脂 (MacCon

* **基金项目**: 国家自然科学基金(81373052)

作者单位: 1. 南方医科大学流行病学系, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学中医药学院; 3. 深圳罗湖区疾病预防与控制中心; 4. 南方医院感染内科

作者简介: 刘优招(1991 −), 女, 广东韶关人, 硕士在读, 研究方向: 感染性疾病的流行病学。

通讯作者: 胡静, E-mail: hjalzh@smu.edu.cn

数字出版日期: 2017 − 2 − 17 14:20

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170217.1420.012.html

Agar, MacCA)、营养琼脂、半固体培养基、Luria-Bertani (LB)增菌肉汤(广州环凯微生物科技有限公司);液体石蜡、三糖铁琼脂、脲酶及精氨酸双水解酶生化管(北京路桥有限公司);氧化酶试纸、触酶(英国 Oxiod 公司);磁株菌种保存管(北京友康恒业生物科技有限公司)。

1.2 菌株　实验用香港海鸥菌 HLHK9 由香港大学袁国勇教授馈赠。该菌株分离自香港一名患有严重腹泻并伴有呕吐和腹痛的病人的粪便标本中,具有香港海鸥菌典型的形态结构和生化特性,其全基因组序列已公布(GenBank 登录号:NR_074669),为研究香港海鸥菌常用的模式菌株[4]。

1.3　菌株纯化培养　无菌条件下,将 HLHK9 划线接种于麦康凯琼脂平板,置于 37 ℃恒温培养 48 h。挑取单个典型菌落(直径在 1.5 ~ 2.0 mm 之间,浅灰色、半透明圆形、中间略凸起、光滑),接种于营养琼脂平板分纯培养(37 ℃,24 h);另挑取单个典型菌落于 LB 肉汤中增菌培养(37 ℃,200 rpm/min)直至菌液 optical density (OD)$_{600nm}$达到 1.0。

1.4　保存方法

1.4.1　半固体石蜡封存法　保存管制备:无菌条件下,将灭菌好的半固体琼脂培养基分装于 2 mL 灭菌冻存管中(每管 1 mL),待冷却凝固后置于 4 ℃冰箱中备用。保菌:无菌条件下,用接种针挑取营养琼脂上单个新鲜香港海鸥菌菌落穿刺接种于半固体琼脂中,半拧紧管盖,并置于 37 ℃培养箱培养 24 h,后向保存管内缓慢加入 400 μL 灭菌液体石蜡,拧紧管盖,分置于室温环境和 4 ℃冰箱中保存。

1.4.2　磁株菌种保存管　无菌条件下,用一次性无菌接种环挑取营养琼脂上新鲜的香港海鸥菌菌落,接种于磁株保存管中。拧紧瓶盖,来回颠倒使菌乳化,配成大约 3 ~ 4 麦氏比浊度的菌悬液。用一次性无菌枪头尽可能吸干溶液并立即放入 -20 ℃和 -80 ℃冰箱中保存。

1.4.3　10% 甘油　无菌条件下,用无菌枪头吸取 LB 肉汤培养的香港海鸥菌新鲜菌液(OD_{600nm} = 1),转移至 1.8 mL 的无菌 EP 管(eppendorf tube)中,8 000 rpm/min 离心 5 min,吸尽上清,加入300 μL 的 10% 甘油重悬细菌,分置于 -20 ℃和 -80 ℃冰箱中保存。

1.4.4　15% 甘油肉汤　无菌条件下,用无菌枪头分别吸取 500 μL 香港海鸥菌的新鲜菌液(OD_{600nm} = 1)及 500 μL30% 甘油于 EP 管中,混匀。甘油在混合物中的最终浓度为 15%。分置于 -20 ℃和 -80 ℃冰箱中保存。

1.4.5　30% 甘油肉汤　方法及步骤同 1.4.4 所述,不同的是使用的甘油浓度为 60% 甘油,最终甘油在混合物的浓度为 30%。

以上 5 种保存方法中:磁珠菌种保存管保存 10 管,其余方法各保存 200 管。半固体石蜡封存法保存的菌种各 100 管置于室温环境和 4 ℃冰箱中保存,其余 4 种方法各 100 管置于 -20 ℃和 -80 ℃冰箱中保存。

1.5　菌种复苏

1.5.1　复苏时间　每次复苏时不同保存方法和存放温度各复苏 2 管,1 个月复苏 1 次,连续试验 12 个月。

1.5.2　具体步骤　半固体石蜡封存法:无菌条件下,用无菌枪头吸尽半固体琼脂上层石蜡,将管内容物全部转移至 9 mL LB 肉汤试管中混匀。磁珠保存法:无菌条件下,用无菌一次性接种环挑取一颗磁珠转至含 1 mL LB 肉汤的 EP 管中,漩涡振荡 15 s。甘油保存法:取出菌种管至完全融化后混匀,无菌条件下,用无菌枪头吸取 100 μL 菌液混合物转移至含 900 μL LB 肉汤的 EP 管中,混匀。经上述处理,获得各方法稀释 10 倍后的菌液,再以 10 倍梯度稀释菌液。保菌后第一天复苏的稀释倍数根据预实验确定,保存特定时间后的复苏稀释倍数根据上一次活菌计数的结果做适当的调整。最后,分别吸取 100 μL 稀释 10^n倍及 10^{n-1}倍(10^n 表示最高稀释倍数)的稀释菌液至标准大小(90 mm)的 MacCA 平板中,用灭菌玻璃棒均匀涂布整个平板,后置于 37 ℃恒温培养 48 h。每个稀释度涂布 3 个平板。

1.6　平板菌落计数和生物学特性检测　MacCA 平板培养 48 h 后,计数每个平板上的菌落数。计数时选取菌落数在 25 ~ 250 之间的平板。以各平板的菌落总数,得出同一稀释度的平均菌落数(colony forming unit, CFU),后计算每 mL 或每颗磁珠的菌落数。同时观察菌落形态,并进行脲酶、三糖铁和精氨酸双水解酶试验。

2　结　果

2.1　菌落计数(图 1、2)　半固体石蜡封存法:室温条件下保存的菌种,活菌菌落数在 6 个月内呈缓慢下降趋势(菌落数的对数值变化 < 1);6 个月后,活菌数快速下降,至第 9 个月时菌落数为 0 CFU/mL。而 4 ℃保存的菌株,在第 1 个月活菌数下降幅度小,1 个月后迅速下降,到第 2 个月时菌落数为 36 CFU/mL,到第 3 个月时为 0 CFU/mL(见图 1)。磁珠、10% 甘油、15% 甘油肉汤和 30% 甘油肉汤保存法:在 -80 ℃条件下,活菌计数在第 1 个月下降比较明显(菌落数的对数值下降 > 1),但 1 年内活菌计数整体呈缓慢下降趋势或基本保持稳定(见图 2)。在 -20 ℃条件下保存 1 个月后,与 -80 ℃有

相同稀释倍数的菌落均无生长。为更好掌握香港海鸥菌在 -20 ℃条件下保存的变化情况,采用 30% 甘油肉汤再次保菌并置于 -20 ℃保存,缩短复苏间隔及调整稀释倍数。菌液在冷冻前的菌落计数为 1.3×10^9 CFU/mL,在保存 15 d、1 个月、2 个月的菌落计数分别为 1.5×10^6 CFU/mL、1.5×10^4 CFU/mL、0 CFU/mL。

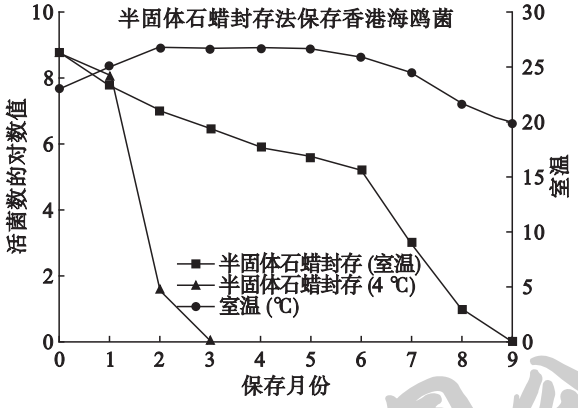


图 1　香港海鸥菌在半固体石蜡封存中的保存效果

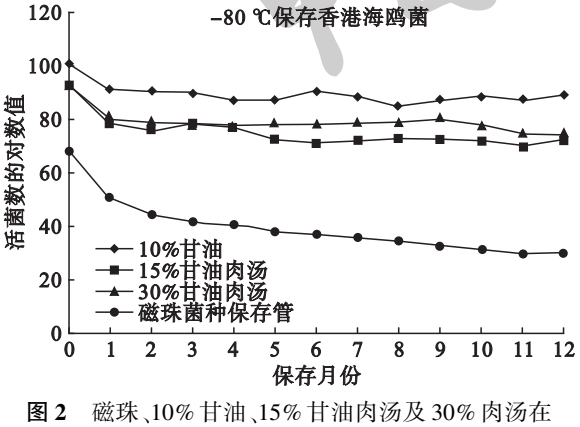
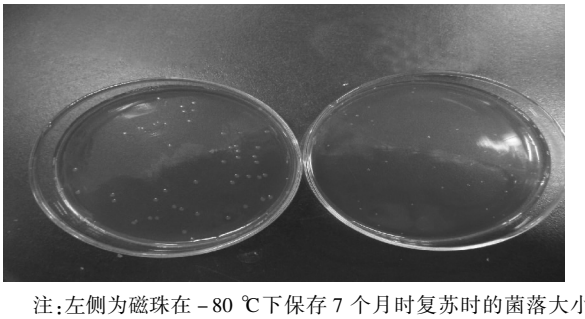


图 2　磁珠、10% 甘油、15% 甘油肉汤及 30% 肉汤在 -80 ℃保存香港海鸥菌的效果

2.2　形态特征与生物学性状(图 3)　半固体石蜡室温保存 7 个月后,生长在 MacCA 平板上的菌落变小,难以从形态大小上辨认出来(图 3 右),但其生化特征未改变。其余 4 种方法在 -80 ℃保存 12 个月后,菌落的形态特征和生化特性均未发生改变。



注:左侧为磁珠在 -80 ℃下保存 7 个月时复苏时的菌落大小(直径在 1.0 ~ 1.5 mm);右侧为半固体石蜡封存法室温下保存 7 个月时复苏的菌落大小(变小,甚至呈针尖样)。

图 3　37 ℃培养 48 h 后,香港海鸥菌生长在麦康凯琼脂平板上的菌落形态

3　讨　论

菌落形成单位(CFU)与一般的计数方式相比,只计算活的菌落,结果可靠;而后者直接在显微镜下计算全部细菌[5]。此外,香港海鸥菌在 MacCA 平板上的形态为单个孤立的菌落,非链状或团块[6-7],故本研究应用 CFU 计数来评价各方法保存香港海鸥菌的效果。

本研究结果提示,半固体石蜡封存法(室温)比较适合短期保存香港海鸥菌。此保存方法的优点为操作简单、不需特殊设备。但不足之处为必须直立存放,不便携带[8-9];且不合适较长时间(>6 个月)保存香港海鸥菌,因保存时间超 7 个月后,菌落形态变小,肉眼难以辨认。此外,在 -80 ℃条件下,磁珠与不同甘油浓度保存的菌种,其菌落数呈缓慢下降或保持相对稳定,而在 -20 ℃条件下保存时间短、效果差,提示磁株或甘油的低温保存(-80 ℃)较为适合香港海鸥菌的长期保存。通过比较上述 5 种方法发现,同一温度下,不同方法保存的菌种的活菌数变化趋势基本一致,但同种方法在不同温度条件下活菌数变化明显,提示温度可能是影响香港海鸥菌保存效果的主要因素,这与空肠弯曲菌的保存结果较为一致[10]。故采用磁珠或甘油保存法并置于 -80℃条件下可长期保存香港海鸥菌;而采用半固体石蜡封存法并置于室温条件下可短期保存,但半年需传代一次。

此外,在本次研究中,用磁珠保存的菌种,每次复苏是从相应条件下(-80 ℃或者 -20 ℃)取同一磁珠菌种保存管,挑取其中一颗磁珠后立刻放入原处,存在菌管反复冻融的可能;而甘油保存的菌种,每次随机抽取两管进行复苏与计数,只复苏一次,不存在反复冻融问题。与甘油保存法相比,磁珠保存的菌落计数呈缓慢下降趋势,可能与反复冻融有关。同时,-80 ℃条件下保存的 4 种方法均在保菌第 1 个月内活菌株有较明显下降可能也与冻融有关。故在实际应用中,需尽量避免反复冻融,对保存的菌种应速取速放。

综上所述,本研究以定量的方式比较了 5 种方法保存香港海鸥菌的效果,成功建立简单实用的短期保存法和长期保存法。菌落形成单位这种定量的方法,其结果比定性方法更形象,更客观,以期为香港海鸥菌的保存工作提供技术参考。

参考文献

[1]　Yuen KY, Woo PC, Teng JL, et al. *Laribacter hongkongensis gen. nov., sp. nov.*, a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(12): 4227 - 4232.

[2]　Woo PC, Poon RW, Foo CH, et al. First report of *Laribacter*

hongkongensis peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis[J]. Perit Dial Int, 2016, 36(1): 105 – 107.
[3] 张爱梅, 郭大城, 王建丽, 等. 国内菌种保藏材料及保藏方法研究现状[J]. 河南预防医学杂志, 2011, 22(6): 405 – 407.
[4] Woo PC, Lau SK. Tse H. et al. The complete genome and proteome of *Laribacter hongkongensis* reveal potential mechanisms for adaptations to different temperatures and habitats[J]. PLoS Genet, 2009, 5(3): e1000416.
[5] 陈燕飞. 两种细菌学检查方法的比较[J]. 中国农学通报, 2010, 26(17): 129 – 131.
[6] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community-acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study[J]. The Lancet, 2004, 363(9425): 1941 – 1947.
[7] Lau SK, Woo PC, Hui WT, et al. Use of cefoperazone MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4839 – 4841.
[8] 董昧. 微生物菌种保藏方法[J]. 煤炭与化工, 2009, 32(7): 34 – 35.
[9] 许丽娟, 刘红, 魏小武. 微生物菌种的保藏方法[J]. 现代农业科技, 2008, 16: 99.
[10] 栾军, 祝长青, 蒋原, 等. 空肠弯曲菌保存方法的比较[J]. 口岸卫生控制, 2007, 12(4): 15 – 17.

收稿日期: 2016-12-01　　(吴少慧编辑　刘铁校对)

· 实验研究 ·

补肾活血中药对肾小球肾炎大鼠肾组织 TGF-β_1 及 CTGF 表达影响*

刘敏[1,2], 谭小月[3], 张勉之[2]

摘　要: 目的　探讨补肾活血中药对肾小球肾炎大鼠肾组织转化生长因子-β1(TGF-β_1)及结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。**方法**　选取 6 月龄 Wister 健康雄性大鼠 40 只, 对其中 30 只大鼠建立肾小球肾炎大鼠模型, 并将此 30 只造模成功的大鼠随机分为模型组、中药组和盐酸贝那普利组, 每组 10 只, 选取另 10 只未建模大鼠作为对照组; 对照组和模型组均给予等量生理盐水灌胃, 中药组给予补肾活血中药灌胃, 盐酸贝那普利组给予西药盐酸贝那普利灌胃, 治疗 8 周后, 测定各组 24h 尿蛋白、血尿素氮和血肌酐水平, 处死后采用免疫荧光化学法检测 TGF-β_1 和 CTGF 蛋白相对表达量。**结果**　干预过程中模型组有 1 只大鼠死亡; 模型组、中药组和盐酸贝那普利组大鼠 24h 尿蛋白分别为(96.58 ± 10.32)、(49.76 ± 9.82)和(50.30 ± 10.02) mg/24h, 血尿素氮分别为(10.82 ± 0.59)、(5.98 ± 0.57)和(6.03 ± 0.52) mmol/L, 血肌酐分别为(33.54 ± 5.32)、(17.89 ± 5.17)和(17.96 ± 5.03) μmol/L, 均高于对照组的(10.38 ± 2.17) mg/24h、(4.01 ± 0.37) mmol/L、(2.55 ± 0.71) μmol/L(均 $P < 0.05$), 且中药组和盐酸贝那普利组 24 h 尿蛋白、血尿素氮和血肌酐水平均低于模型组(均 $P < 0.05$), 而中药组和盐酸贝那普利组各指标水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$); 模型组、中药组和盐酸贝那普利组大鼠 TGF-β_1 免疫荧光相对含量分别为(5.296 ± 0.124)、(0.568 ± 0.156)和(1.697 ± 0.468), CTGF 免疫荧光相对含量分别为(5.347 ± 1.285)、(1.485 ± 0.466)和(1.078 ± 0.327), 均高于对照组的(0.035 ± 0.007)和(0.017 ± 0.004)(均 $P < 0.05$), 且中药组和盐酸贝那普利组 TGF-β_1 和 CTGF 免疫荧光相对含量均低于模型组(均 $P < 0.05$), 中药组 TGF-β_1 免疫荧光相对含量低于盐酸贝那普利组($t = 7.237$, $P < 0.001$), 而 2 组 CTGF 免疫荧光相对含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论**　补肾活血中药可明显降低肾小球肾炎大鼠实验室相关指标, 抑制 TGF-β_1 和 CTGF 表达水平。

关键词: 补肾活血中药; 肾小球肾炎; 大鼠肾组织; 转化生长因子-β1(TGF-β_1); 结缔组织生长因子(CTGF)
中图分类号: R 994.39　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2017)03-0474-05　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-03-35

Effect of Chinese medicine for invigorating kidney and promoting blood circulation on expressions of TGF-β_1 and CTGF in renal tissues of rats with glomerular nephritis

LIU Min*, TAN Xiao-yue, ZHANG Mian-zhi (* *Graduate School of Tianjin Medical University*, *Tianjin* 300070, China)

Abstract: Objective　To observe the effect of the Chinese medicine for invigorating kidney and promoting blood circulation on expressions of transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) and connective tissue growth factor (CTGF) in renal tissues of the rats with glomerular nephritis. **Methods**　Thirty healthy male Wister rats aged 6 months were adopted to construct a animal glomerular nephritis model and then randomly divided into a model group (MG), Chinese medicine group (CMG) and benazepril group (BG); another 10 rats of the same batch were used as a control group (CG). The

* **基金项目:** 天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCYBJC28200)
作者单位: 1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市公安医院; 3. 天津南开大学医学院
作者简介: 刘敏(1981 –), 女, 天津人, 主治医师, 硕士在读, 研究方向: 中西医结合慢性肾脏病的基础与临床研究。
通讯作者: 张勉之, E-mail: zhangmianzhi@vip.sina.com
数字出版日期: 2017 – 2 – 17 14:37
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170217.1437.024.html