



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106718914 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611209707.9

(22)申请日 2016.12.23

(71)申请人 叶宗耀

地址 525132 广东省茂名市化州市笪桥镇
柑村官田村28号

(72)发明人 叶宗耀

(74)专利代理机构 北京精金石专利代理事务所
(普通合伙) 11470

代理人 刘晔

(51) Int. Cl.

A01H 4/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种红豆杉培养基

(57)摘要

本发明属于植物培养基技术领域,具体涉及一种红豆杉培养基。本发明红豆杉培养基,包括以下成分及其浓度:基础培养基B5 40-50g/L,蔗糖25-40g/L,萘乙酸0.5-1.5mg/L,吲哚-3-乙酸1-3mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.1-1mg/L,赤霉素1.5-2.5mg/L,酪蛋白氨基酸5-8g/L,小麦胚芽油1-10g/L,冬枣汁5-15g/L,聚乙烯吡咯烷酮0.5-1.5mg/L,桂皮酸0.1-1g/L,花生四烯酸1-5mg/L,茉莉酸甲酯0.01-0.15mg/L,聚氨基葡萄糖1-5mg/L。本发明培养基能够加快愈伤组织的形成,有效防止组织褐变,与此同时能够提高愈伤组织中紫杉醇的含量。

1. 一种红豆杉培养基,其特征在于,包括以下成分及其浓度:基础培养基B540-50g/L,蔗糖25-40g/L,萘乙酸0.5-1.5mg/L,吲哚-3-乙酸1-3mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.1-1mg/L,赤霉素1.5-2.5mg/L,酪蛋白氨基酸5-8g/L,小麦胚芽油1-10g/L,冬枣汁5-15g/L,聚乙烯吡咯烷酮0.5-1.5mg/L,桂皮酸0.1-1g/L,花生四烯酸1-5mg/L,茉莉酸甲酯0.01-0.15mg/L,聚氨基葡萄糖1-5mg/L。

2. 根据权利要求1所述红豆杉培养基,其特征在于,由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吲哚-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,冬枣汁10.35g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸1.75mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L,聚氨基葡萄糖3.6mg/L。

3. 根据权利要求1或2所述红豆杉培养基的制备方法,其特征在于,分为以下步骤:

(1) 准确称取基础培养基B5、蔗糖,酪蛋白氨基酸,聚乙烯吡咯烷酮,桂皮酸,聚氨基葡萄糖。溶于800mL超纯水中,搅拌均匀,116℃灭菌30min,得溶液I;

(2) 将灭菌后的溶液I冷却至40℃,将压榨得到的冬枣汁,小麦胚芽油,萘乙酸,吲哚-3-乙酸,6-苄氨基腺嘌呤,赤霉素,花生四烯酸,茉莉酸甲酯在无菌条件下加入溶液I中搅拌均匀,经0.22μm的滤膜过滤后,得溶液II;

(3) 调整上述溶液II的pH至5-6,即得。

4. 根据权利要求3所述红豆杉培养基的制备方法,其特征在于,所述培养基的pH调至5.5-5.8。

一种红豆杉培养基

技术领域

[0001] 本发明属于植物培养基技术领域,具体涉及一种红豆杉培养基。

背景技术

[0002] 红豆杉又称紫杉,树形优美,材质优良,具有较高的园艺观赏价值,还是珍贵的用材树种。红豆杉中的抗癌活性成分紫杉醇能够有效抑制肿瘤细胞的增生和繁殖,对多种癌症的防治具有显著疗效,被世人誉为“植物黄金”。

[0003] 目前紫杉醇的唯一来源是从红豆杉树皮中提取,分离,且紫杉醇的含量非常低,大约为干重的万分之一左右,加之红豆杉属植物生长极其缓慢,因而为了解决紫杉醇药源的问题,人们从化学合成,人工栽培,真菌发酵生产,植物细胞培养等方面进行了探索。由于目前化学合成大多只能从紫杉烷类物质合成,而紫杉烷类物质在红豆杉中含量同样很低,固其成本昂贵。如果人工栽培,至少需要30年以上树龄的的红豆杉才能提取紫杉醇,周期长,成本也比较高。而细胞培养能够连续均匀生产,外界条件影响不大,而且可以在生物反应器中大规模培养,易于提高产量和进行产物的分离提取纯化,是进行工业化生产的首选方法。

[0004] 中国专利申请(CN105400841A)公布了一种红豆杉培养基,解决现有技术中植物细胞培养基对红豆杉细胞培养密度较低的技术问题。该培养基以硝酸钠和磷酸氢二钾分别作为氮源和磷源,并添加了一定的氯化钙,在此基础上意外的发现通过添加特定种类及成分的中药材有助于提升细胞培养密度。基于以上有益的发现,本发明通过实验手段优选了黄蜀葵、火绒草、鸡眼草、剪刀草、腊梅花、苦木、辣蓼草、江南卷柏、瓜子金等原本用于人类疾病治疗的中药材成分,所得培养基意外获得了突出的培养效果,使得红豆杉细胞的培养密度得到显著提升,同时其生长速度更快。

[0005] 目前,在红豆杉细胞培养过程中存在的主要问题:一是愈伤组织形成慢;二是产生的愈伤组织不能够利用;三是形成的愈伤组织容易褐化;四是形成的愈伤组织中紫杉醇含量低。

发明内容

[0006] 为解决上述问题,本发明提供了一种红豆杉培养基。本发明培养基能够加快愈伤组织的形成,有效防止组织褐变,与此同时能够提高愈伤组织中紫杉醇的含量。

[0007] 本发明通过以下技术方案实现:

[0008] 一种红豆杉培养基,包括以下成分及其浓度:基础培养基B540-50g/L,蔗糖25-40g/L,萘乙酸0.5-1.5mg/L,吲哚-3-乙酸1-3mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.1-1mg/L,赤霉素1.5-2.5mg/L,酪蛋白氨基酸5-8g/L,小麦胚芽油1-10g/L,冬枣汁5-15g/L,聚乙烯吡咯烷酮0.5-1.5mg/L,桂皮酸0.1-1g/L,花生四烯酸1-5mg/L,茉莉酸甲酯0.01-0.15mg/L,聚氨基葡萄糖1-5mg/L。

[0009] 优选地,所述红豆杉培养基由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吲哚-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,

酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,冬枣汁10.35g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸1.75mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L,聚氨基葡萄糖3.6mg/L。

[0010] 蔗糖是红豆杉细胞培养中主要的碳源,同时蔗糖的浓度对红豆杉细胞生长和紫杉醇的生成有重要影响。本发明技术人员发现在红豆杉培养基中蔗糖浓度在25-40g/L范围内对红豆杉细胞的生长和紫杉醇的积累有明显的促进作用。

[0011] 本发明培养基中酪蛋白氨基酸(CAS号:9000-71-9)和赤霉素的加入,能够促进紫杉醇细胞的生长。

[0012] 激素是调节植物细胞生长发育和代谢产物形成的主要物质,在本发明培养基中,萘乙酸,吲哚-3-乙酸,6-苄氨基腺嘌呤使用浓度比例为2:3:1时,对红豆杉细胞的生长促进作用和紫杉醇的积累作用效果最佳。

[0013] 小麦胚芽油是以小麦芽为原料制取的一种谷物胚芽油,它集中了小麦的营养精华,富含维生素E、亚油酸、亚麻酸、甘八碳醇及多种生理活性组分,具有很高的营养价值。

[0014] 冬枣(学名:*Ziziphus jujuba* cv. Dongzao),又名鲁北冬枣、冻枣、雁过红等。冬枣中含有丰富的糖类、维生素C,以及环磷酸腺苷,还含有较多的维生素A、维生素E、钾、钠、铁、铜等多种微量元素。本发明技术人员将成熟后的冬枣榨汁后,加入到红豆杉培养基中,不仅能够起到防止愈伤组织褐化的作用,而且能够有效地促进红豆杉细胞生长。

[0015] 花生四烯酸,茉莉酸甲酯和聚氨基葡萄糖是生产紫杉醇的诱导子,三者共同作用,有效促进了紫杉醇的生成。

[0016] 所述红豆杉培养基制备方法,分为以下步骤:

[0017] (1)准确称取基础培养基B5、蔗糖,酪蛋白氨基酸,聚乙烯吡咯烷酮,桂皮酸,聚氨基葡萄糖。溶于800mL超纯水中,搅拌均匀,116℃灭菌30min,得溶液I;

[0018] (2)将灭菌后的溶液I冷却至40℃,将压榨得到的冬枣汁,小麦胚芽油,萘乙酸,吲哚-3-乙酸,6-苄氨基腺嘌呤,赤霉素,花生四烯酸,茉莉酸甲酯在无菌条件下加入溶液I中搅拌均匀,经0.22μm的滤膜过滤后,得溶液II;

[0019] (3)调整上述溶液II的pH5-6,即得。

[0020] 优选地,所述培养基的pH为5.5-5.8。

[0021] 本发明红豆杉培养基可用于红豆杉细胞悬浮培养、红豆杉愈伤组织诱导和继代培养。

[0022] 本发明红豆杉培养基各组分搭配合理,并且在相应的浓度范围内各组分相互之间能够起到协同作用。本发明红豆杉培养基与现有技术相比,具有以下显著效果:

[0023] (1)本发明培养基用于红豆杉愈伤组织诱导培养时能够提高愈伤组织的生长率和缩短平均出愈时间;

[0024] (2)本发明培养能够有效抑制愈伤组织的褐化情况;

[0025] (3)本发明培养基培养基能够促进紫杉醇的合成积累。

具体实施方式

[0026] 以下通过具体实施方式的描述对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制,本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0027] 原材料小麦胚芽油购于濮阳中禾工贸有限公司;聚氨基葡萄糖购于河南金润食品添加剂有限公司;大枣汁由市场购买的大枣新鲜压榨得到。

[0028] 实施例1 一种红豆杉培养基

[0029] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吡啶-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,大枣汁10.35g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸1.75mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L,聚氨基葡萄糖3.6mg/L。

[0030] 红豆杉培养基制备方法,分为以下步骤:

[0031] (1) 准确称取基础培养基B5、蔗糖,酪蛋白氨基酸,聚乙烯吡咯烷酮,桂皮酸,聚氨基葡萄糖。溶于800mL超纯水中,搅拌均匀,116℃灭菌30min,得溶液I;

[0032] (2) 将灭菌后的溶液I冷却至40℃,将压榨得到的大枣汁,小麦胚芽油,萘乙酸,吡啶-3-乙酸,6-苄氨基腺嘌呤,赤霉素,花生四烯酸,茉莉酸甲酯在无菌条件下加入溶液I中搅拌均匀,经0.22μm的滤膜过滤后,得溶液II;

[0033] (3) 调整上述溶液II的pH为5.8,即得。

[0034] 实施例2 一种红豆杉培养基

[0035] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度:基础培养基B540g/L,蔗糖25g/L,萘乙酸0.5mg/L,吡啶-3-乙酸1mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.1mg/L,赤霉素1.5mg/L,酪蛋白氨基酸5g/L,小麦胚芽油1g/L,大枣汁5g/L,聚乙烯吡咯烷酮0.5mg/L,桂皮酸0.1g/L,花生四烯酸1mg/L,茉莉酸甲酯0.01mg/L,聚氨基葡萄糖1mg/L。

[0036] 所述红豆杉培养基制备方法与实施例1类似。

[0037] 实施例3 一种红豆杉培养基

[0038] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度:基础培养基B550g/L,蔗糖40g/L,萘乙酸1.5mg/L,吡啶-3-乙酸3mg/L,6-苄氨基腺嘌呤1mg/L,赤霉素2.5mg/L,酪蛋白氨基酸8g/L,小麦胚芽油10g/L,大枣汁15g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.5mg/L,桂皮酸1g/L,花生四烯酸5mg/L,茉莉酸甲酯0.15mg/L,聚氨基葡萄糖5mg/L。

[0039] 所述红豆杉培养基制备方法与实施例1类似。

[0040] 对比例1 一种红豆杉培养基

[0041] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吡啶-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤1.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,大枣汁10.35g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸1.75mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L,聚氨基葡萄糖3.6mg/L。

[0042] 所述红豆杉培养基制备方法与实施例1类似。

[0043] 与实施例1的区别在于,增加了6-苄氨基腺嘌呤的浓度。

[0044] 对比例2 一种红豆杉培养基

[0045] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吡啶-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,维生素C 3.6mg/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸1.75mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L,聚氨基葡萄糖3.6mg/L。

[0046] 所述红豆杉培养基制备方法与实施例1类似。

[0047] 与实施例1的区别在于,将冬枣汁替换为维生素C。

[0048] 对比例3 一种红豆杉培养基

[0049] 一种红豆杉培养基,由以下成分及其浓度组成:基础培养基B545g/L,蔗糖30g/L,萘乙酸1.0mg/L,吲哚-3-乙酸1.5mg/L,6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L,赤霉素1.75mg/L,酪蛋白氨基酸7.5g/L,小麦胚芽油5g/L,冬枣汁10.35g/L,聚乙烯吡咯烷酮1.2mg/L,桂皮酸0.89g/L,花生四烯酸5.35mg/L,茉莉酸甲酯0.03mg/L。

[0050] 所述红豆杉培养基制备方法与实施例1类似。

[0051] 与实施例1的区别在于,未添加聚氨基葡萄糖,增加了花生四烯酸浓度。

[0052] 试验例1 愈伤组织诱导培养

[0053] (1) 外植体消毒

[0054] 先用洗洁精洗去枝叶表面灰尘,清水冲洗3-4小时,在用75%的乙醇浸泡1-2分钟,升汞常规消毒10-15min,无菌蒸馏水冲洗4-6次并用无菌纸吸干,备用。

[0055] (2) 接种

[0056] 用手术刀去掉茎段(分老茎段和幼嫩茎段)的针叶切至1cm左右的长度,或用嫩的针叶切割成0.5-1cm的小段接种于不同培养基上。5-6cm幼嫩小枝或去年生小枝切割2刀,成上、中、下3段,垂直插入、或者斜放于实施例1-3及对比例1-3制备得到的培养基中(培养基中还加有2%的琼脂)。每个瓶接种4到5块外植体。

[0057] (3) 培养

[0058] 将上述接种后的外植体进行暗诱导培养:温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $85\% \pm 5\%$ 条件下暗培养12小时。然后进行弱光诱导培养:经暗培养12小时后,转为每天白天温度 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,光照 $1000-1200\mu\text{x}$ 下弱光培养,每12小时转换条件一次。

[0059] (4) 愈伤组织生长指标

[0060] 诱导率(%): $\text{诱导率}(\%) = \frac{\text{长出愈伤组织的外植体块数}}{\text{接入外植体块数} - \text{被污染外植体块数}} \times 100$;

[0061] 平均出愈时间:平均出愈时间=总出愈时间/外植体数

[0062] 各培养基中愈伤组织诱导率和平均出愈时间如以下表1所示。

[0063] 表1各培养基中愈伤组织诱导率和平均出愈时间

[0064]

培养基	诱导率(%)	平均出愈时间(天)
实验例1	86	7
实验例2	79	12
实验例3	82	15
对比例1	63	18
对比例2	67	24
对比例3	68	16

[0065] 由表1可知,实施例培养基培养红豆杉愈伤组织诱导率明显高于对比例,其中实施例1制备得到的培养基愈伤组织诱导率最高,是对比例3的1.3倍;并且实施例培养基中红豆杉愈伤组织平均出愈时间比对比例培养基愈出时间短。由此可知本发明培养基有利于愈伤组织的形成。

[0066] 试验例2 不同培养基中愈伤组织在继代培养时的褐变情况

[0067] 利用实施例1-3及对比例1-3培养基进行愈伤组织的继代培养,并观察在培养过程各培养基中愈伤组织的褐变情况,结果如表2所示。

[0068] 表2不同培养基中愈伤组织在继代培养时的褐变情况

[0069]

培养基	褐化程度
实施例1	-
实施例2	-
实施例3	-
对比例1	+
对比例2	++
对比例3	+

[0070] 注：“+”表示轻度褐化；“++”表示严重褐化；“+++”表示褐化非常严重；“-”表示基本无褐化现象。

[0071] 由表2可以看出,实施例1-3制备得到的红豆杉培养基均能有效抑制愈伤组织的褐化。其中,对比例2培养基中出现严重的褐化,而实施例1中未出现褐化,说明冬枣汁的添加对抑制愈伤组织褐化现象作用明显。

[0072] 试验例3 愈伤组织中紫杉醇含量的测定

[0073] 将上述试验例1各培养基中培养30天后的愈伤组织在60℃下烘干至恒重,研碎至0.25mm。以氯仿:甲醇=6:4回流提取3次,浓缩、石油醚脱酯,然后减压真空低温干燥至恒重。准确称取待测样品适量,加流动相溶解,配成浓度为0.3mg/mL的待测溶液,精密进样分析。结果如表3所示。

[0074] 表3不同培养基愈伤组织中紫杉醇含量

[0075]

培养基	实施例 1	实施例 2	实施例 3	对比例 1	对比例 2	对比例 3
紫杉醇含量 (10^{-6} mol/L)	393	372	384	212	313	280

[0076] 由表3可知,实施例1-3培养基培养得到的愈伤组织中紫杉醇含量均高于对比例,实施例1培养基愈伤组织中紫杉醇含量与对比例1相比提高了85.4%。