



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102807974 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201210282562. 0

(22) 申请日 2012. 08. 10

(71) 申请人 福建农林大学

地址 350002 福建省福州市仓山区建新镇金山学区

(72) 发明人 封磊 万晓琦 洪伟 吴承祯
宋萍

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

C12N 11/10 (2006. 01)

C12N 11/04 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种雷公藤细胞固定化的构建方法

(57) 摘要

本发明公开了一种雷公藤细胞固定化的构建的方法。通过对雷公藤细胞的培养与取得、细胞固定化的制备建立固定化细胞培养系。本发明主要包含四项关键技术,分别为:(1)雷公藤细胞的培养与取得;(2)细胞固定化的制备;(3)固定化细胞培养系的建立;(4)固定化细胞的释放。通过对本发明产生的雷公藤固定化细胞进行雷公藤甲素含量的测定,发现固定化细胞内雷公藤甲素的含量高达 56.5591 μ g/g,而雷公藤固定化细胞外的溶液中雷公藤甲素的含量高达 2.6218mg/L,具有较高的应用价值。

1. 一种雷公藤细胞的固定方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 雷公藤细胞的培养与取得:摘取野生雷公藤进行诱导,培养出愈伤组织并将其继代三次以上,而后将继代后的愈伤组织切成碎末状,置于 white 培养液中,振荡培养 5~6d, 获得雷公藤悬浮细胞溶液;其中所述的 white 培养液为:21.26g white 培养基+0.5mL IBA+0.5mL 2,4-D+0.1ml KT, pH=5.8;

2) 细胞固定化的制备方法:取海藻酸钠水溶液、CaCl₂ 水溶液、NaCl 水溶液进行灭菌处理;取出雷公藤悬浮细胞溶液,过滤后将残渣放入海藻酸钠溶液中搅拌均匀,将搅拌均匀所得的混合溶液缓慢滴入 CaCl₂ 溶液中,使其形成圆形的凝胶珠,将凝胶珠在 CaCl₂ 水溶液中浸泡一小时,之后将浸泡的 CaCl₂ 溶液倒掉,加入 NaCl 水溶液洗涤一至两分钟,重复洗涤三次;所述的海藻酸钠水溶液浓度为 30g/L; 所述 CaCl₂ 水溶液浓度为 8g/L; 所述 NaCl 水溶液浓度为 9g/L;

3) 固定化细胞培养体系建立:将洗涤后的凝胶珠放入如步骤 1) 所述的 white 培养液中,振荡培养 24d, 每 12d 继代一次;

4) 固定化细胞的释放:将步骤 3) 中培养完成后的培养液进行过滤,过滤出来的凝胶珠放入 0.1mol/L, PH=7.8 磷酸缓冲液中振荡,待凝胶珠溶散后,再次过滤,过滤后的残渣即得雷公藤细胞。

2. 如权利要求 1 所述的一种雷公藤细胞的固定方法,其特征在于步骤 1) 与步骤 3) 中振荡培养的条件均为在 25 °C、黑暗条件、振荡速率为 110r/min。

一种雷公藤细胞固定化的构建方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种利用固定化载体材料固定雷公藤细胞的方法,并初步建立了最优固定化雷公藤细胞体系。

背景技术

[0002] 雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hok. f1)是一种双子叶木质藤本植物,也是一种珍贵的药用植物。分布于南方福建、江西、浙江、广东、湖南、湖北、台湾等省份。雷公藤提取物中含有 70 种以上的有效成分,主要有 ;生物碱类、二萜类、三萜类、倍半萜类等次生代谢物。这些成分具有解毒散结、活血化瘀、消炎、抗肿瘤、免疫调整、抗炎、抗生育、抗 HIV 等多种药理作用。广泛用于治疗类风湿性关节炎、肺病、肾病、皮肤病、白血病等疾病。

[0003] 由于植物此生代谢产物具有极其复杂的化学结构,至今仍没有找到有效的或经济合成方法。近几十年来利用植物细胞培养技术生产次生代谢产物的研究获得了快速发展,其中固定化细胞技术在药用植物次生代谢产物的工业化生产上具有极大的应用潜力和广阔的发展前景。

[0004] 微生物固定化细胞技术是 20 世纪 80 年代兴起的一种生物技术。所谓固定化细胞就是指用物理或化学的手段将游离细胞定位于限定的空间区域,仍保留催化活性且在反复或连续使用后仍具有催化活力。固定化细胞保持了胞内酶系的原始状态和天然环境,有效地利用游离细胞的完整酶系统和细胞膜的选择通透性,既具有固定化酶的优点,又具有其自身的优越性。

[0005] 植物细胞固定化后可以进行高密度增殖培养,提高生物反应器单位体积的生物转化速率,延长发酵细胞的生命,增加稳定性,利于实现连续化生产等 ;与悬浮培养相比,它还具有抗剪功能增强,耐受有毒前体的浓度高,易于积累和分离次生产物等优点。

[0006] 自 Brodelius 在 1979 年首次利用藻酸钙凝胶固定化培养长春花生产次生产物以来,通过固定化培养植物细胞生产活性产物的研究取得了重大进展。目前,国内外已建立了包括银杏、莨菪、长春花、红豆杉、人参等药用植物在内的 50 余种植物细胞固定化培养系统,所产次生代谢物包括有生物碱类、甙类、黄酮类、醌类等。上述研究证明,药用植物细胞在固定化培养条件下不仅表现出较好的次生代谢产物释放能力,而且多数活性产物的产量要高于传统悬浮细胞培养。因此,面临雷公藤植物资源少、有效成分含量低的问题,本研究提出开展雷公藤固定化细胞培养生产甲素的研究,从而为甲素的高效生产开辟新的途径。雷公藤甲素是雷公藤中活性最高的环氧二萜内酯化合物,是雷公藤中主要的活性成分,可有效治疗自身免疫性疾病,并具明显的抗白血病和抗肿瘤活性,且相关药用效价比雷公藤总苷高 100-200 倍。由于具有广泛的药理作用,雷公藤甲素已成为使用最为广泛的雷公藤活性物质,目前是雷公藤片、雷公多甙片等成药制剂的主要成分。

目前国内外尚未见有关利用固定化载体对雷公藤细胞进行固定的报道,本发明首次建立了利用固定化载体对雷公藤进行固定的方法及体系。

发明内容

[0007] 本发明的目的是建立雷公藤细胞固定化培养体系,主要包含四项关键技术,分别为:(1)雷公藤细胞的培养与取得;(2)细胞固定化的制备;(3)固定化细胞培养系的建立;(4)固定化细胞的释放。

[0008] 本发明是通过以下方法实现的:

一种雷公藤细胞的固定方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 雷公藤细胞的培养与取得:摘取野生雷公藤进行诱导,培养出愈伤组织并将其继代三次以上,而后将继代后的愈伤组织切成碎末状,置于 white 培养液中,振荡培养 5~6d,获得雷公藤悬浮细胞溶液;其中所述的 white 培养液为:21.26g white 培养基+0.5mL IBA+0.5mL 2,4-D+0.1ml KT, pH=5.8;

2) 细胞固定化的制备方法:取海藻酸钠水溶液、CaCl₂ 水溶液、NaCl 水溶液进行灭菌处理;取出雷公藤悬浮细胞溶液,过滤后将残渣放入海藻酸钠溶液中搅拌均匀,将搅拌均匀所得的混合溶液缓慢滴入 CaCl₂ 溶液中,使其形成圆形的凝胶珠,将凝胶珠在 CaCl₂ 水溶液中浸泡一小时,之后将浸泡的 CaCl₂ 溶液倒掉,加入 NaCl 水溶液洗涤一至两分钟,重复洗涤三次;所述的海藻酸钠水溶液浓度为 30g/L;所述 CaCl₂ 水溶液浓度为 8g/L;所述 NaCl 水溶液浓度为 9g/L;

3) 固定化细胞培养体系建立:将洗涤后的凝胶珠放入如步骤 1)所述的 white 培养液中,振荡培养 24d,每 12d 继代一次;

4) 固定化细胞的释放:将步骤 3)中培养完成后的培养液进行过滤,过滤出来的凝胶珠放入 0.1mol/L, PH=7.8 磷酸缓冲液中振荡,待凝胶珠溶散后,再次过滤,过滤后的残渣即得雷公藤细胞。

[0009] 其中,步骤 1)与步骤 3)中振荡培养的条件均为在 25 °C、黑暗条件、振荡速率为 110r/min。

[0010] 本发明公开了一种利用固定化载体材料固定雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hok. f1)细胞的方法,并初步建立了最优固定化雷公藤细胞体系。该体系的建立,对于雷公藤甲素的高效生产开辟新的途径。实验证明固定化雷公藤细胞能够富集大量的雷公藤甲素。

[0011] 说明书附图:

图 1 和图 2:雷公藤固定化细胞的效果。

具体实施方式

[0012] 现举例说明本发明,但本发明内容不限于此。

[0013] 实施例 1

① 雷公藤细胞的培养与取得:摘取野生雷公藤进行诱导,培养出愈伤组织继代三次以上,而后取生长势头良好的愈伤组织进行称量、切碎,取 0.8g 置于盛有 white 培养液(white 培养基:21.26g white 培养基+0.5mL IBA+0.5mL 2,4-D+0.1ml KT, pH=5.8。)的 250ml 的三角瓶中,25 °C 黑暗条件下的振荡培养箱中以 110r/min 的速率振荡培养 6d,得到悬浮细胞。

[0014] ② 细胞固定化的制备方法:取 30g/L 海藻酸钠水溶液、8g/L CaCl₂ 水溶液;9g/L

NaCl 水溶液进行灭菌处理。将悬浮细胞过滤后,取滤渣放入 100mL 灭菌后的海藻酸钠水溶液中搅拌均匀,将混合物吸入注射器中,再由注射器缓慢滴入 CaCl_2 溶液中,使其形成圆形凝胶珠,滴完后凝胶珠在 CaCl_2 溶液中浸泡一小时,然后将浸泡的 CaCl_2 溶液倒掉,加入 NaCl 溶液洗涤一至两分钟,将水倒掉,重复三次。

[0015] ③ 固定化细胞培养体系建立:将洗涤完的凝胶珠放入盛有如步骤①所述的 white 培养液的 250ml 的三角瓶中,放入设置为 110r/min, 25 °C 黑暗条件下的振荡培养箱中振荡培养。为避免培养液中的营养都被消耗完,需要每 12d 继代一次。继代一次后取出。

[0016] ④ 固定化细胞的释放:将步骤③中继代完成后的三角瓶中的物质进行过滤,过滤出的凝胶珠的放入 0.1mol/L, PH=7.8 磷酸缓冲液中振荡处理,待凝胶珠溶散后再次过滤,过滤后的残渣即为雷公藤细胞。

[0017] 雷公藤固定化细胞的效果如图 1 所示。

[0018] 由实施例 1 得到的雷公藤甲素的测定:

在步骤④中,过滤出来的培养液用 0.22 μm 有机系微孔滤头滤至离心管,留待测雷公藤甲素。将雷公藤细胞,进行研磨,加入 5ml 甲醇,移至离心管,放至 10 小时,在 4°C 条件下,8000r/min 离心 10 分钟,沉淀后,取上清液,留待测雷公藤甲素。

[0019] 利用高效液相色谱分别对固定化细胞外的培养液及固定化细胞内的雷公藤甲素浓度进行检测,雷公藤甲素标准品购于成都普瑞法科技开发有限公司。液相色谱仪的参数设置为:流动相为 60% 甲醇,40% 水;流速为 1mL/min,检测波长 208nm。检测前将流动相,超纯水,甲素标准溶液和发酵液样品预先超声波处理半小时。所得的雷公藤固定化细胞中胞内与胞外的雷公藤甲素的含量如表 1 所示。从中可知,固定化雷公藤细胞能够富集大量的雷公藤甲素。

[0020] 表 1 雷公藤固定化细胞甲素含量

样品	胞外甲素	胞内甲素
实施例 1	2.6218 mg/L	56.5591 $\mu\text{g/g}$

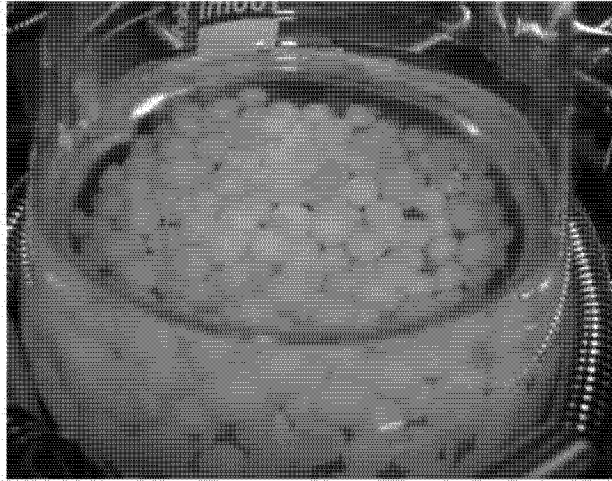


图 1

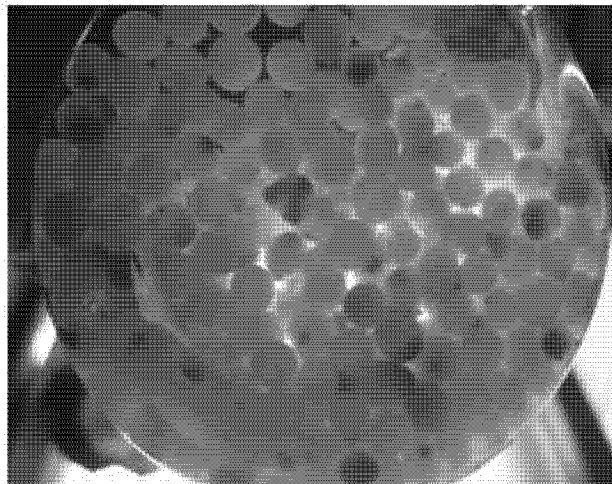


图 2