



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102771397 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 27

(21) 申请号 201210293609. 3

(22) 申请日 2012. 08. 17

(73) 专利权人 成都市三禾田生物技术有限公司
地址 610041 四川省成都市高新区科园南路
88 号 9 栋 2 层 201 号

(72) 发明人 柴素真 洪汉君 张宗申 熊小灿
冯敏

(74) 专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理
有限公司 51214
代理人 詹永斌 钱成岑

(51) Int. Cl.
A01H 4/00(2006. 01)

(56) 对比文件

- CN 1280191 A, 2001. 01. 17, 全文.
- US 2002/0142463 A1, 2002. 10. 03, 全文.
- CN 1565171 A, 2005. 01. 19, 全文.
- WO 2008/100016 A1, 2008. 08. 21, 全文.
- KR 10-2006-0062692 A, 2006. 06. 12, 全文.
- DENG Xue-Tao et al.. A New

Triterpenoid Saponin from Psammosilene
tunicoides. 《Chinese Journal of Natural

Medicines》. 2009, 第 7 卷 (第 2 期), 全文.

李景滨等. 金铁锁组培苗快繁技术研究. 《广
东农业科学》. 2011, (第 2 期), 全文.

杨耀文等. 珍稀濒危药用植物金铁锁的组织
培养和快速繁殖研究. 《世界科学技术 - 中医药
现代化》. 2003, 第 5 卷 (第 4 期), 第 57 页中栏
第 2 行 - 第 58 页左栏第 3 行.

韦伟等. 不同培养基成分对金铁锁愈伤组
织生长及皂苷含量积累的影响. 《时珍国医国
药》. 2010, 第 21 卷 (第 5 期), 对比文件 2 第 1208
页“摘要”部分和左栏“2. 1 愈伤组织诱导与培养”
部分.

审查员 陈瑞

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54) 发明名称

一种金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培
养方法

(57) 摘要

本发明以金铁锁植株幼嫩叶或茎为外植体,
成功诱导金铁锁愈伤组织, 并建立了光照和暗培
养条件下的金铁锁愈伤组织培养体系, 诱导愈伤
组织分化产生不定根, 建立金铁锁不定根培养体
系. 并对金铁锁总皂苷的含量进行测定, 进一步优
化植物细胞培养的条件和参数, 建立金铁锁高产
细胞培养体系, 从而实现金铁锁植物细胞规模化
培养生产不定根替代金铁锁原植物入药。

CN 102771397 B

1. 一种金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于具体步骤如下:

(1) 植物材料的选取与消毒处理

选取金铁锁叶或切成 1~3cm 的小段的金铁锁茎为外植体,并对其进行消毒处理;

(2) 植物愈伤组织的诱导

将步骤(1)中外植体接种于诱导培养基,在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养,在 25 天时挑选质地松散、生长良好的愈伤组织用于继代培养,所述诱导培养基为 MS 培养基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L + 半胱氨酸 $0 \sim 2.0\text{mg/L}$, pH=6.0;

(3) 植物愈伤组织的继代培养

取步骤(2)中得到的愈伤组织 0.5g 接种于组织培养用培养基,进行继代培养 2~4 次,每隔 15 天继代一次,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养,所述植物愈伤组织继代培养所用培养基为: MS 培养基 + 蔗糖 40g/L + KNO_3 1.9 g/L + NH_4NO_3 1.65 g/L + KH_2PO_4 1 mmol/L + CaCl_2 4.5mmol/L;

(4) 不定根的诱导及继代培养

采用不定根诱导培养基对步骤(3)中得到的愈伤组织进行不定根诱导培养,所述不定根诱导培养基附加 3% 蔗糖、1-2mg/L 吲哚丁酸、0.2mg/L 激动素的 MS 培养基,在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下培养;待成功诱导出不定根后,对不定根进行继代培养两次以上,每隔 20 天继代一次,继代培养具体方法如下:将成团生长的金铁锁不定根捣碎,剔除颜色发黑、生长老化的部分,取生长比较旺盛、颜色较浅的不定根接种于内装 100mL 培养基的 250mL 的三角瓶中,每瓶的接种量为鲜重 1.0g,在普通摇床中振荡培养,转速为 100r/min,温度为 25°C ;

(5) 生物反应器大规模培养金铁锁不定根

将步骤(4)中经继代培养的成团的金铁锁不定根捣碎,剔除其老化部分,作为反应器培养的材料,每个反应器装有 500mL MS 液体培养基,pH 值 6.0,含有 3% 蔗糖、1-2mg/L 吲哚丁酸、0.2mg/L 激动素,接种量为 5g,整个操作在超净台内完成,然后在温度为 25°C ,通气量为 0.020-0.035 vvm 的条件下进行大规模培养。

2. 根据权利要求 1 所述的金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于:步骤(1)中所述消毒处理的具体步骤为:

1) 对材料进行流水冲洗;

2) 用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;

3) 用 0.1% HgCl_2 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;

4) 再用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次;

5) 用无菌滤纸吸干水分。

3. 根据权利要求 1 所述的金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于:步骤(1)中所述金铁锁茎被切成 1.6-2.0cm 长。

4. 根据权利要求 1 所述的金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于:步骤(2)中所述诱导培养基中的半胱氨酸的含量为 1.5 mg/L。

5. 根据权利要求 1 所述的金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于:在用生物反应器进行大规模培养之前对不定根不同根系进行筛选及扩繁从而选择最优不定根系进行大规模培养,其具体步骤如下:

对培养出的不同生长情况、不同颜色及不同粗细的不定根进行分类,进行扩繁与继代

培养,待株系稳定后,进行活性成分的测定,并建立相应成分的指纹图谱,然后根据检测结果筛选出最优不定根系。

6. 根据权利要求 5 所述的金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法,其特征在于:所述最优不定根系为颜色呈黄褐色、生长旺盛的健壮不定根系。

一种金铁锁不定根培养体系的建立与扩大培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种利用植物组织培养技术诱导与培养不定根系的方法,特别涉及一种金铁锁状不定根系的诱导与生物反应器扩大培养方法。

背景技术

[0002] 金铁锁(*Psammosilene tuniceoides* W. C. Wu et C. Y. Wu)为石竹科金铁锁属植物,是我国西南地区特有的药用植物。金铁锁主要以根入药,临床上常用于治疗类风湿性关节炎等疾病。金铁锁主要化学成分是三萜、三萜皂苷、环肽以及内酰胺。药理试验表明,金铁锁总皂苷镇痛和抗炎效果明显。传统的中草药获取方法是以采集和消耗大量的野生植物资源为代价的,当采集和消耗量超过自然资源的再生能力时,必然会导致物种濒危甚至灭绝。近年来由于金铁锁的市场需求不断增加,野生植物资源数量急剧下降,已成为珍稀濒危物种。

[0003] 为了解决药用植物的供需矛盾,人们多采用人工栽培的方法扩大药源。但在人工栽培的药用植物中,一些药用植物生产周期很长,若以常规方法育种或育苗,需要花费较长时间。还有一些药用植物因繁殖系数小、耗种量大,导致发展速度很慢且生产成本增加。另外一些药用植物,则因病毒危害导致退化,严重影响了产量和品质。

[0004] 为保证药用植物资源的可持续利用,利用生物工程的途径对珍贵资源进行细胞或组织培养、有效成分的关键基因克隆与转化等技术,可能是解决中药产业化的有效途径。于是,积极研究药用植物资源的再生技术,使有限的资源为人类持续利用迫在眉睫。应用植物组织培养生产药用植物,具有不受地区、季节与气候限制,便于工厂化生产等优势,同时组织培养中的细胞生长速度要比植物正常生长速度快,接近于分生组织的生长速度,因此利用组织培养手段快速繁殖药用植物种苗,或者利用组织培养或细胞培养手段直接生产药物便随之日益发展。

[0005] 在金铁锁植物细胞培养方面,欧阳志勤等进行了金铁锁离体培养和快速繁殖试验,他们将金铁锁茎尖、带芽的茎段诱导分化和培养得到植物芽、带芽茎段和愈伤组织无根苗,进一步增殖培养,无根苗形成试管苗。杨耀文等对金铁锁进行了组织培养和快速繁殖研究,他们以金铁锁幼嫩茎段为外植体,从而获得组织培养苗。为了实现金铁锁的快速繁殖,他们进一步使用正交试验探讨不同生长调节剂对其增殖的影响和最佳培养条件的筛选,发现 MS 培养基 + BA 0.5mg/L + KT 0.1mg/L + IAA 0.1mg/L + 2,4-D 0.5mg/L 培养基,培养温度 $19.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$,光照强度 1200Lx,光照周期 12 小时为最优培养条件。

[0006] 但是到目前为止,金铁锁植物细胞培养还停留在离体培养和快速繁殖研究层面,还未见有关利用植物细胞培养技术培养金铁锁组织,金铁锁次生代谢产物皂苷的细胞内合成途径,以及通过综合调控技术提高金铁锁植物细胞生物量,进而提高金铁锁总皂苷等次生代谢产物含量方面的报道。主要问题是对金铁锁植物细胞培养的生长稳定性、培养条件和各种调节参数、细胞生长与次生代谢产物积累的矛盾研究不足。

[0007] 本发明建立了金铁锁愈伤组织和不定根培养体系,大大降低愈伤的褐化率并提高

愈伤诱导率,确定了愈伤组织和不定根的生长周期,通过植物细胞培养获得其药用成分皂苷。进一步优化了细胞愈伤组织培养和悬浮培养的条件和参数,促使植物细胞次生代谢向着有利于皂苷类物质合成的方向进行,进而提高皂苷类物质含量。为金铁锁不定根利用生物反应器大规模培养及生产奠定了基础。组织培养技术特别是大规模工业化培养技术,对解决药用植物资源紧张的现状具有重要意义。

发明内容

[0008] 本发明目的在于通过组织培养技术和发酵工程技术手段大量生产金铁锁不定根,以得到金铁锁次生代谢产物,从而替代野生资源,以保证中药的可持续利用。本发明以金铁锁植株幼嫩茎为外植体,成功诱导金铁锁愈伤组织,并建立了光照和暗培养条件下的金铁锁愈伤组织培养体系,并诱导产生不定根,建立金铁锁不定根培养体系。进而对金铁锁总皂苷的含量进行测定,建立金铁锁高产细胞培养体系,以现金铁锁植物细胞规模化培养生产不定根替代金铁锁原植物入药。

[0009] 本发明所述技术方案的具体步骤如下:

[0010] (1) 植物材料的选取与消毒处理

[0011] 选取金铁锁叶或切成 1~3cm 的小段的金铁锁茎为外植体,并对其进行消毒处理。所述消毒过程如下:

[0012] 1) 对材料进行流水冲洗;

[0013] 2) 用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;

[0014] 3) 用 0.1% HgCl_2 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;

[0015] 4) 再用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次;

[0016] 5) 用无菌滤纸吸干水分。

[0017] (2) 植物愈伤组织的诱导

[0018] 将步骤(1)中的外植体接种于诱导培养基,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养,10d 左右开始长出乳白色愈伤组织;20d 左右愈伤组织逐渐覆盖外植体,在 25d 时挑选质地松散、生长良好的愈伤组织用于继代培养。植物愈伤组织诱导所用培养基为:MS 培养基 + 2,4-D(2,4-二氯苯氧基乙酸)0.5 mg/L + NAA(萘乙酸)0.5 mg/L + KT(激动素)0.1mg/L + 半胱氨酸 0~2.0mg/L, pH6.0。

[0019] (3) 植物愈伤组织的培养

[0020] 取步骤(2)中得到的愈伤组织 0.5g 接种于组织培养用培养基进行继代培养 2~4 次,每隔 15d 继代一次,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养。植物愈伤组织继代培养所用培养基为:MS 培养基 + 蔗糖 40g/L + KNO_3 1.9 g/L + NH_4NO_3 1.65 g/L + KH_2PO_4 1 mmol/L + CaCl_2 4.5mmol/L。

[0021] (4) 不定根的诱导及继代培养

[0022] 采用附加 3% 蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1-2mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L 的 MS 培养基对步骤(3)中得到的愈伤组织进行不定根诱导培养,在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下培养;待成功诱导出不定根后(约培养 30d),对不定根进行继代培养两次以上,每隔 20 天继代一次,具体方法如下:将成团生长的金铁锁不定根捣碎,剔除颜色发黑、生长老化的部分,取生长比较旺盛、颜色较浅的不定根接种于内装 100mL 液体培养基(附加 3% 蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1-2mg/L、

激动素(KT)0.2mg/L的MS培养基)的250mL的三角瓶中,每瓶的接种量为1.0g左右(鲜重),在普通摇床中振荡培养,转速为100r/min,温度为25℃;

[0023] (5)生物反应器大规模培养金铁锁不定根

[0024] 将步骤(4)中继代培养的成团的金铁锁不定根捣碎,剔除其老化部分,作为反应器培养的材料。每个反应器装有500mL MS培养基,pH值6.0,含有3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA)1-2mg/L、激动素(KT)0.2mg/L,接种量为5g左右,整个操作在超净台内,培养温度为25℃,通气量为0.025 m³/h。

[0025] 作为一种优选,在进行上述方案的步骤(5)之前对不定根不同根系进行筛选和扩繁,从而选择最优不定根系进行大规模培养,其具体步骤如下:

[0026] 对培养出的不同生长情况、不同颜色及不同粗细的不定根进行分类,进行扩繁与继代培养,待株系稳定后,进行活性成分(总皂苷)的测定,并建立相应成分的指纹图谱,然后根据检测结果筛选出最优不定根系,并接种于内装含3%蔗糖的MS液体培养基的不同体积三角瓶中,并加入浓度为1mg/L的IBA植物生长调节剂,在100r/min速度的摇床上、25℃的温度下进行扩繁,培养周期为3-4周。

[0027] 金铁锁总皂苷的提取

[0028] 金铁锁总皂苷的最佳提取工艺为:将金铁锁根粉碎后用80%乙醇浸渍3次,48h/次,过滤,滤液减压浓缩成浸膏,加水溶解,水溶液经DM-101型大孔吸附树脂柱层析,分别用10%、20%及80%的乙醇洗脱,收集80%乙醇洗脱液,减压浓缩经喷雾干燥得金铁锁提取物。

[0029] MS培养基的组成

[0030] MS培养基是Murashige和Skoog于1962年为烟草细胞培养设计的,其中固体培养基是在配制1000ml培养基时,加硝酸铵1.65克、硝酸钾1.9克、氯化钙0.44克、硫酸镁0.37克、磷酸二氢钾0.17克、碘化钾0.83毫克、硼酸6.2毫克、硫酸锰22.3毫克、硫酸锌8.6毫克、钼酸钠0.25毫克、硫酸铜0.025毫克、氯化钴0.025毫克、硫酸亚铁27.8毫克、乙二胺四乙酸二钠37.3毫克、肌醇100mg,甘氨酸2mg,盐酸硫胺素0.1mg,盐酸吡哆醇0.5mg,烟酸0.5mg,蔗糖30g和琼脂7g。液体培养基不含琼脂,其他成分与固体培养基相同。

[0031] 本发明所述反应器的灭菌及接种方法

[0032] 1)反应器的清洗:肥皂水洗涤一次,清水反复冲洗数次,最后用蒸馏水冲洗干净;

[0033] 2)灭菌:采用高压蒸汽灭菌锅湿热灭菌,反应器装入培养液后进行实罐灭菌,在121℃下灭菌30min,灭菌冷却后打开锅盖,立即取出灭菌物品,置于超净台,紫外线灭菌15min;

[0034] 3)接种:在超净台将反应器的塞子打开,并用外火焰烧瓶口,打开装有金铁锁不定根的摇瓶,将瓶口在火焰上烧,迅速将不定根放入反应器中,将反应器的塞子在火焰上灭菌以后,拧紧塞子,熄灭火焰;

[0035] 4)安装仪器:将反应器放置好,接通电源,开启空气压缩机,打开流量计,调至较大量程,将进气口连接流量计的那端硅胶管在火焰上灭菌,用火焰烧烤流量计的出口,迅速将硅胶管接入出口;

[0036] 5)通气、培养 打开置于进气口处硅胶管上的夹子通气,调节流量,开始培养。

- [0037] 本发明中所涉及的测定方法
- [0038] 不定根鲜重的测定方法
- [0039] 将培养得到的不定根用滤纸吸去表面的培养基,置于万分之一天平称重。
- [0040] 组织干重的测定方法
- [0041] 将测定完鲜重的不定根首先在 105℃下烘 30min,使其酶系灭活;再在 60℃的条件下,烘至恒重,置于万分之一天平称重即可。
- [0042] 增殖倍数的测定方法
- [0043] 增殖倍数 = (收获时的重量 - 接种量) / 接种量
- [0044] 愈伤组织诱导率的测定方法
- [0045] 愈伤组织诱导率 (%) = 诱导出的愈伤组织块数 / 接种的愈伤组织块数
- [0046] 愈伤组织褐化率的测定方法
- [0047] 愈伤组织褐化率 (%) = 发生褐化的愈伤组织块数 / 愈伤组织总块数
- [0048] 本发明具有以下有益效果:
- [0049] 1、能够保证在一个限定的生产系统中连续、均匀地生产,不使用农药化肥、不受病虫害、地理和季节等各种环境因素的影响;
- [0050] 2、可以在生物反应器中进行大规模培养,通过细胞生长的自动控制和代谢过程的合理调节保证产品产量和质量稳定,并通过控制环境条件得到超过整株植物含量水平的代谢产物;
- [0051] 3、所获得的产物可以从培养体系内直接提取,并快速、高效地回收利用,从而简化了分离与纯化的步骤;
- [0052] 4、有利于研究植物的代谢途径,还可以利用某些基因工程手段探索与创造新的合成途径,从而得到价值更高的代谢产物;
- [0053] 5、还可以节省大量用于种植原植物的土地,降低了生产成本,提高了生产效率;
- [0054] 6、大大降低了愈伤组织的褐化率并提高愈伤组织的诱导率,
- [0055] 7、组织培养一般的周期为 1-2 个月,比野外生长要短的多。不定根的反应器培养方法简单、效率高,次生代谢产物含量高、主要皂苷成分均得以表达且其比例与药材相近;
- [0056] 8、不定根生长迅速、无内生真菌污染,本培养工艺操作简单、重复性好、规模生产迅速方便。

具体实施方式

[0057] 下面通过实施例对本发明所述技术方案作进一步说明,但本发明的保护范围不限于下述实施例。下列实施例中所用的金铁锁植株为市售或采自四川省甘孜州九龙县海拔 2500 米的贡嘎山。

[0058] 实施例 1

[0059] (1) 选取金铁锁叶作为外植体,进行消毒处理:流水冲洗后用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1% HgCl₂ 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;后用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次,最后无菌滤纸吸干水分;

[0060] (2) 诱导愈伤组织:将步骤(1)中的外植体接种于愈伤组织诱导培养基:MS 培

培养基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L+ 半胱氨酸 1.0mg/L , pH6.0, 在 25±1℃下暗培养。叶片接种于诱导培养基 10d 左右开始长出乳白色愈伤组织;20d 左右愈伤组织逐渐覆盖外植体,在 25d 时挑选质地松散、生长良好的愈伤组织进行继代培养;

[0061] (3) 诱导愈伤组织继代培养:取步骤(2)中得到的愈伤组织 0.5g 接种于 MS 培养基 + 蔗糖 40g/L + KNO₃ 1.9 g/L + NH₄NO₃ 1.65 g/L + KH₂PO₄ 1 mmol/L + CaCl₂ 4.5mmol/L 进行继代培养,每隔 15d 继代一次,在 25±1℃下暗培养;

[0062] (4) 不定根的诱导及继代培养

[0063] 取步骤(2)中继代培养了 3 次的愈伤组织接种于附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1.5mg/L、激动素(KT)0.2mg/L 的 MS 培养基中进行不定根诱导培养,在 25±1℃下暗培养;待成功诱导出不定根后(约培养 30d),将成团生长的金铁锁不定根捣碎,剔除颜色发黑、生长老化的部分,取生长比较旺盛、颜色较浅的不定根接种于内装 100mL 液体培养基(附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1.5mg/L、激动素(KT)0.2mg/L 的 MS 液体培养基)的 250mL 的三角瓶中进行继代培养,每瓶的接种量为 1.0g 左右(鲜重),在普通摇床中振荡培养,转速为 100r/min,温度为 25℃下暗培养,每隔 20 天继代一次;

[0064] (5) 生物反应器大规模培养金铁锁不定根

[0065] 将步骤(4)中继代培养了 2 次的成团的金铁锁不定根捣碎,剔除其老化部分,作为反应器培养的材料,每个反应器装有 500mL MS 液体培养基, pH 值 6.0,含有 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1.5mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L,接种量为 5g 左右,整个操作在超净台内完,培养温度为 25℃,通气量为 0.020vvm。

[0066] 实施例 2

[0067] (1) 选取长度为 1.0-1.5cm 的金铁锁茎段作为外植体,进行消毒处理:流水冲洗后用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1% HgCl₂ 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;后用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次,最后无菌滤纸吸干水分;

[0068] (2) 诱导愈伤组织:将步骤(1)中的外植体接种于愈伤组织诱导培养基:MS 培养基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L+ 半胱氨酸 2.0mg/L , pH6.0, 在 25±1℃下暗培养。叶片接种于诱导培养基 10d 左右开始长出乳白色愈伤组织;20d 左右愈伤组织逐渐覆盖外植体,在 25d 时挑选质地松散、生长良好的愈伤组织进行继代培养;

[0069] (3) 诱导愈伤组织继代培养:取步骤(2)中得到的愈伤组织 0.5g 接种于 MS 培养基 + 蔗糖 40g/L + KNO₃ 1.9 g/L + NH₄NO₃ 1.65 g/L + KH₂PO₄ 1 mmol/L + CaCl₂ 4.5mmol/L 进行继代培养,每隔 15d 继代一次,在 25±1℃下暗培养;

[0070] (4) 不定根的诱导及继代培养

[0071] 取步骤(2)中继代培养了 4 次的愈伤组织接种于附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L 的 MS 培养基中进行不定根诱导培养,在 25±1℃下暗培养;待成功诱导出不定根后(约培养 30d),将成团生长的金铁锁不定根捣碎,剔除颜色发黑、生长老化的部分,取生长比较旺盛、颜色较浅的不定根接种于内装 100mL 液体培养基(附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L 的 MS 液体培养基)的 250mL 的三角瓶中进行继代培养,每瓶的接种量为 1.0g 左右(鲜重),在普通摇床中振荡培养,转速为 100r/min,温度为 25℃,自然光照培养,每隔 20 天继代一次;

[0072] (5) 不定根的筛选及扩繁:对步骤(4)中继代 3 次后培养出的不同生长情况、不

同颜色及不同粗细的不定根进行分类,然后再进行继代培养,待株系稳定后,进行活性成分(总皂苷)的测定,并建立相应成分的指纹图谱,检测结果显示,颜色呈黄褐色、生长旺盛的健壮的不定根系中所含活性成分最高,为最优不定根系,将其接种于内装含 3%蔗糖的 MS 液体培养基的不同体积三角瓶中,并加入浓度为 1mg/L 的 IBA 植物生长调节剂,在 100r/min 速度的摇床上、25℃避光条件下进行扩繁,培养周期为 3-4 周;

[0073] (6) 生物反应器大规模培养金铁锁不定根

[0074] 将步骤(5)中经扩繁得到的成团的金铁锁不定根捣碎,剔除其老化部分,作为反应器培养的材料,每个反应器装有 500mL MS 液体培养基, pH 值 6.0,含有 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 1mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L,接种量为 5g 左右,整个操作在超净台内完,培养温度为 25℃,通气量为 0.030vvm。

[0075] 实施例 3

[0076] (1) 选取长度为 2.0-3.0cm 的金铁锁茎段作为外植体,进行消毒处理:流水冲洗后用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1% HgCl₂ 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;后用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次,最后无菌滤纸吸干水分;

[0077] (2) 诱导愈伤组织:将步骤(1)中的外植体接种于愈伤组织诱导培养基:MS 培养基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L, pH6.0,在 25±1℃、自然光照下培养。叶片接种于诱导培养基 10d 左右开始长出乳白色愈伤组织;20d 左右愈伤组织逐渐覆盖外植体,在 25d 时挑选质地松散、生长良好的愈伤组织进行继代培养;

[0078] (3) 诱导愈伤组织继代培养:取步骤(2)中得到的愈伤组织 0.5g 接种于 MS 培养基 + 蔗糖 40g/L + KNO₃ 1.9 g/L + NH₄NO₃ 1.65 g/L + KH₂PO₄ 1 mmol/L + CaCl₂ 4.5mmol/L 进行继代培养,每隔 15d 继代一次,在 25±1℃、自然光照下培养;

[0079] (4) 不定根的诱导及继代培养

[0080] 取步骤(2)中继代培养了 2 次的愈伤组织接种于附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 2mg/L、激动素(KT)0.2mg/L 的 MS 培养基中进行不定根诱导培养,在 25±1℃、自然光照下培养;待成功诱导出不定根后(约培养 30d),将成团生长的金铁锁不定根捣碎,剔除颜色发黑、生长老化的部分,取生长比较旺盛、颜色较浅的不定根接种于内装 100mL 液体培养基(附加 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 2mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L 的 MS 液体培养基)的 250mL 的三角瓶中进行继代培养,每瓶的接种量为 1.0g 左右(鲜重),在普通摇床中振荡培养,转速为 100r/min,温度为 25℃,自然光照培养,每隔 20 天继代一次;

[0081] (5) 生物反应器大规模培养金铁锁不定根

[0082] 将步骤(4)中继代培养了 4 次的成团的金铁锁不定根捣碎,剔除其老化部分,作为反应器培养的材料,每个反应器装有 500mL MS 液体培养基, pH 值 6.0,含有 3%蔗糖、吲哚丁酸(IBA) 2mg/L、激动素(KT) 0.2mg/L,接种量为 5g 左右,整个操作在超净台内完,培养温度为 25℃,通气量为 0.035vvm。

[0083] 实施例 4 半胱氨酸含量对愈伤组织褐化率的影响

[0084] (1) 选取长度为 1.0-3.0cm 的金铁锁茎段作为外植体,进行消毒处理:流水冲洗后用吐温 20 浸泡 25min,无菌水冲洗 3 次;再用 0.1% HgCl₂ 处理 8min,无菌水洗冲 3 次;后用 75% 乙醇处理 8s,无菌水冲洗 3 次,最后无菌滤纸吸干水分;

[0085] (2) 诱导愈伤组织:将步骤(1)中的外植体接种于愈伤组织诱导培养基:MS 培养

基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L+ 半胱氨酸 0~2.0mg/L , pH6.0, 在 25±1℃下暗培养。接种时对于半胱氨酸含量分别为 0 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、1.5 mg/L、2.0mg/L 的 5 种培养基, 各取 1000 个外植体接种于其上, 培养 25d 后计算褐化率, 结果显示外植体在 5 种培养基上的愈伤组织褐化率分别为 36.6%、37.5%、28.1%、20.9%、29.5%, 半胱氨酸的含量 1.5 mg/L 时, 可以明显降低愈伤的褐化率。

[0086] 实施例 5 外植体尺寸对愈伤组织诱导率的影响

[0087] (1) 选取茎段长度分别为 1.0-1.5cm (105 个)、1.6-2.0cm (278 个) 和 2.0-3.0cm (117 个) 的三组金铁锁茎段外植体, 进行消毒处理: 流水冲洗后用吐温 20 浸泡 25min, 无菌水冲洗 3 次; 再用 0.1% HgCl₂ 处理 8min, 无菌水洗冲 3 次; 后用 75% 乙醇处理 8s, 无菌水冲洗 3 次, 最后无菌滤纸吸干水分;

[0088] (2) 诱导愈伤组织: 将步骤(1)中的外植体接种于愈伤组织诱导培养基: MS 培养基 + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 0.1mg/L+ 半胱氨酸 1.5mg/L , pH6.0, 在 25±1℃下暗培养。培养 25d 后, 统计愈伤组织诱导率, 结果显示三组外植体的愈伤组织诱导率分别为 55.7%、68.7%、58.5%, 选取长度为 1.6-2.0cm 的茎段, 具有较高的愈伤组织诱导率。

[0089] 实施例 6 金铁锁总皂苷含量测定

[0090] 分别称取野生金铁锁根、实施例 3 中经步骤(3)继代培养 2 次的愈伤组织和实施例 3 中经步骤(3)继代培养 2 次的不定根, 以同样方法提取其总皂苷, 具体步骤为: 将原料干燥、粉碎后用 80% 乙醇浸渍 3 次, 48 h / 次, 过滤, 滤液减压浓缩成浸膏, 加水溶解, 水溶液经 DM-101 型大孔吸附树脂柱层析, 分别用 10%、20% 及 80% 的乙醇洗脱, 收集 80% 乙醇洗脱液, 减压浓缩经喷雾干燥得金铁锁提取物。计算粗总皂苷重量百分含量, 结果显示,

[0091] 具体结果对比如下:

[0092]

种类	干重 (g)	粗总皂苷重量 (g)	粗总皂苷含量 (%)
金铁锁药材	150.2	7.62	5.07
金铁锁植物愈伤组织	97.8	5.75	5.88
金铁锁植物不定根	94.5	7.17	7.52