

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810010878.8

[51] Int. Cl.

C12N 5/04 (2006.01)

C12P 7/26 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 36/30 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 101289651A

[22] 申请日 2008.4.1

[21] 申请号 200810010878.8

[71] 申请人 大连普瑞康生物技术有限公司

地址 116620 辽宁省大连市大连海湾工业园区
普兰店市长店堡社区

[72] 发明人 刘汉石

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

一种新疆紫草细胞系和细胞培养生产新疆紫草紫草素的方法

耕地、不破坏新疆紫草野生资源，保护了生态环境，解决了新疆紫草资源短缺的问题。

[57] 摘要

本发明提供了一种稳定、高产紫草素的新疆紫草紫红色细胞系，紫草素化合物含量可达培养物干重的 6-8%，是野生天然新疆紫草的 5-9 倍。本发明还提供了一种该细胞系的培养技术及大规模快速生产该细胞系培养物的方法。该方法打破了常规的紫草细胞二步培养法，采用一步培养法进行紫草细胞培养物的培养，并由此实现了细胞悬浮培养及固体培养基培养相结合的方法对新疆紫草细胞进行生产，快速生产有效成分。该方法采用液-固培养相结合，通过液体培养制种，固体培养得到培养物，从中选择综合性状好的留种用于液体培养，如此反复。采用此种方法生产新疆紫草细胞与野生型相比生产周期大大缩短，并且质量稳定、有效含量高。并且，采用此种方法生产新疆紫草细胞不占

- 1、一种新疆紫草紫红色细胞系，其通过如下方法制备获得：采用新疆紫草的种胚或种子萌发的无菌苗为外植体，经诱导愈伤组织并反复继代培养，从分离的细胞系中选择颜色鲜艳呈紫红色、结构致密，团块状的培养物，即得。
- 2、如权利要求1所述的细胞系，其为新疆紫草紫红色细胞系。
- 3、由权利要求1或2所述细胞系获得的培养物。
- 4、权利要求1或2所述细胞系的继代培养方法，其特征在于所用培养基为含有0.1-0.5mg/L IAA和1-5 mg/L KT的N6培养基，培养温度为23~25℃，无光照培养，30~35天继代一次。
- 5、如权利要求4所述的继代培养方法，其特征在于，继代时选择生长旺盛、颜色鲜艳呈紫红色、结构致密、团块状结构明显的培养物继代。
- 6、如权利要求5所述的继代培养方法，其特征在于，继代时还包括对培养物中紫草素及其衍生物（ β ， β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、去氧紫草素、消旋乙酰阿卡宁、乙酰阿卡宁、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、消旋紫草素、 β -羟基异戊酰阿卡宁、1-甲氧基乙酰紫草素、乙酰紫草素等，均属2,4-萘醌类有机化合物）含量进行考察，选择综合性状好的培养物继代。
- 7、如权利要求3所述培养物的大规模生产方法，其步骤包括：
 - 1) 将权利要求1或2所述细胞系采用液体摇床培养的方法制种；
 - 2) 将步骤1)得到的种子用于固体培养；
 - 3) 选择步骤2)培养物中生长旺盛、颜色鲜艳、紫红色特征的培养物留种，用于步骤1)的摇床培养，其余收获，得培养物。
- 8、如权利要求7所述的方法，其特征在于，步骤1)液体摇床培养所用培养基为添加0.1-0.5mg/L IAA和1-5 mg/L KT的N6液体培养基，接种量3-6%，培养条件：PH值为5.2-5.8，培养温度为23-25℃，摇床转速100-120 rpm，无光照培养，培养时间8-10天。
- 9、如权利要求8所述的方法，其特征在于，步骤2)固体培养选择颜色鲜艳、呈紫红色、长势良好、分散性好、颗粒均匀、无污染的培养物作种子进行固态培养生产，接种到含0.1-0.5mg/L IAA和1-5 mg/L KT的N6固体培养基，接种量为4-6 mm，培养条件：温度23~25℃，无光照培养，培养30~35天。
- 10、如权利要求7-9任一项所述的方法，其特征在于，还包括对培养物的紫草素及其衍生物（ β ， β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、去氧紫草素、消旋乙酰阿卡宁、乙酰阿卡宁、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、消旋紫草素、 β -羟基异戊酰阿卡宁、1-甲氧基乙酰紫草素、乙酰紫草素等，均属2,4-萘醌类有机化合物）含量进行考察，选择综合性状好的培养物留种。
- 11、权利要求1或2所述细胞系在制备食品、保健食品、化妆品、保健品和药品中应用。

1 2 、权力要求 3 所述培养物在制备食品、保健食品、化妆品、保健品和药品中应用。

一种新疆紫草细胞系和细胞培养生产新疆紫草紫草素的方法

技术领域

本发明涉及一种新疆紫草细胞系，本发明还涉及该细胞系的制备方法及其培养物的生产方法。

背景技术

紫草为唇形目紫草科的一种以根入药的多年生草本药用植物。我国紫草资源大体可分为：新疆紫草 (*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.)、硬紫草 (*Lithospermum erythrorhizon* S. et Z.)、滇紫草 (*Onosma paniculata* Bur. Et Fr.)、内蒙紫草 (*Arnebia guttata* Bunge.) 和西藏紫草 (*Onosma hookeri* Clarke var. *Longiflorum* Duthie.) 等类别。其中，新疆紫草因色素含量高和药理作用好而成为商品紫草的主要来源。

新疆紫草，习称软紫草，生长于海拔 2500-4200 米高的山野林中或向阳坡地，主要分布于新疆、西藏等地。株高 15-35cm，外表紫红色，根粗壮。药用部分为其根部，药用成分为紫草素及其衍生物，主要包括：紫草素、 β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、去氧紫草素、消旋乙酰阿卡宁、乙酰阿卡宁、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、消旋紫草素、 β -羟基异戊酰阿卡宁、1-甲氧基乙酰紫草素、乙酰紫草素等，均属 2, 4-萘醌类有机化合物。

新疆紫草中所含的紫草素及其衍生物具有重要的药用价值。研究表明：紫草素及其衍生物具有抗肿瘤、抗艾滋病、抗病毒、抗菌、消炎以及促进循环系统循环的作用。外用可治疗皮肤癌、红斑狼疮、湿疹、带状疱疹和烧烫伤；内服可用于绒毛膜上皮癌、病毒性肝炎、肺癌及肝癌放化疗的辅助治疗。同时，紫草素及其衍生物因具有色价高、附着力强以及吸收紫外辐射功能强的优点，成为理想的天然红色素，国际上被誉为红色素之王。

虽然我国紫草资源较为丰富，但因人们过度采集，野生紫草资源已接近枯竭。但是在医药产业中对新疆紫草所含的紫草素及其衍生物的需求量又较大，因而出现了严重的供需矛盾。寻找到合适的新疆紫草的繁殖方法，快速生产紫草素及其衍生物以满足市场需求，具有重要意义。

目前，对新疆紫草组织培养方面的研究主要集中在两方面：一方面，从愈伤组织中筛选出优良细胞系，用以生产有用的次生代谢产物；另一方面，利用组织培养技术，诱导并筛选出优良品系，并进一步将其快速繁殖成完整植株。目前对于新疆紫草的研究主要集中在前者，但因其具有生产条件要求高，工艺复杂，流程长，生产成本高的缺点，因而该项技术的推广应用受到了极大地限制，有待于进一步研究。

发明内容

本发明的第一个目的在于提供一种高产紫草素的新疆紫草细胞系。本发明以新疆紫草(其根、茎、叶，或者由种子萌发的无菌苗)作为外植体，诱导愈伤组织，通过反复继代培养，

得到三种新疆紫草细胞系：白色系、黄色系、紫红色系；对3种细胞系分别进行继代培养，通过对其生长速度、紫草素化合物含量的检测，确定紫红色细胞系为长势较好，紫草素化合物含量最高的细胞系。从分离的细胞系中选择颜色鲜艳呈紫红色、结构致密、团块状的培养物，即为本发明细胞系。

本发明进一步对获得的紫红色细胞系进行继代培养和筛选，综合考察有效成分的含量以及生长特征，最终获得了可以无限传代培养的稳定高产新疆紫草细胞系。该细胞系具有以下特征：生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、呈团块状，质地均匀、略偏硬，紫草素及其衍生物含量为培养物干重的6-8%，培养周期30-35天。具体地说，可通过如下方法制备得到上述细胞系：

1) 新疆紫草无菌苗的培育

取天然新疆紫草的种子，已通过中国科学院研究所标本馆（国家植物标本馆）鉴定，先用75%酒精浸泡10-30s，然后用1%的氯化汞溶液消毒8-12min，再用无菌水反复冲洗4-5次，最后放在无菌滤纸上吸干种子表面水分，用无菌镊子接种在基本MS（配方见附表1）中添加10-30g/L蔗糖、0.6g/L琼脂的固体培养基，23-25℃，无光照培养，约10天种子即可萌发长出无菌苗。

2) 愈伤组织的诱导和培养

取无菌苗根、茎、叶及子叶、胚芽做外植体，在无菌条件下，用无菌手术剪刀和无菌镊子将无菌苗根、茎、叶及子叶、胚芽切成2-5mm长的小段，接种在N6（配方见附表2）中添加0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L琼脂及30g/L蔗糖的固体培养基上，23-25℃暗培养，7-10天诱导出愈伤组织。

3) 愈伤组织的继代筛选

本发明通过对新疆紫草愈伤组织的诱导和培养得到了三种新疆雪莲细胞系：白色系、黄色系和紫红色系；对3种细胞系分别进行了继代培养，通过对其生长速度、紫草素及其衍生物含量的检测，确定紫红色细胞系为长势较好，紫草素及其衍生物含量最高的细胞系。

选取紫红色细胞系为原始细胞系，用目测法从固体培养基中挑选颜色较深、色彩鲜亮的紫红色愈伤组织在N6（配方见附表2）中添加0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L琼脂及30g/L蔗糖的固体培养基上继续继代培养。为更好的优化种子、纯化细胞系，继代时接种块大小控制在3mm以下。如此反复，对所选择细胞系逐步驯化，本发明经过近100代筛选获得了可以无限传代培养的稳定高产新疆紫草细胞系。

本发明的第二个目的在于提供上述新疆紫草细胞系培养物的继代培养方法，其所用培养基为N6（配方见附表2）中添加0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L琼脂及30g/L蔗糖，pH值5.2-5.8，接种块为4-6mm，培养条件：温度23-25℃，无光照，培养时间30-35天。继代时选择生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、呈团块状，质地均匀、略偏硬为特征的培养物继代。此外还对培养物紫草素及其衍生物（ β ， β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、

去氧紫草素、消旋乙酰阿卡宁、乙酰阿卡宁、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、消旋紫草素、 β -羟基异戊酰阿卡宁、1-甲氧基乙酰紫草素、乙酰紫草素等，均属 2,4-萘醌类有机化合物)的含量进行考察，选择综合性状好的培养物继代。

本发明的第三个目的在于提供一种大规模生产上述细胞系培养物的方法。本发明方法将液体摇床培养与固体培养相结合，包括如下步骤：1) 采用液体摇床培养的方法制种；2) 培养物中生长旺盛、颜色鲜艳、紫红色特征的培养物留种，用于步骤 1) 的摇床培养，其余收获，得培养物。

具体地说，可采用如下方法进行大规模生产：

用高产新疆紫草细胞系做种子，于装有 150mL 液体培养基的 500mL 培养瓶中悬浮培养，液体培养基为 N6 (配方见附表 2) 中添加 0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、及 30g/L 蔗糖，pH 值 5.2-5.8，接种量 3-6% (W/V, g.fw/ml)，培养条件：温度为 23-25℃，摇床转速 100-120 rpm，培养时间 8-10 天，无光照培养。

从液体培养基中挑选生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，分散性好、颗粒均匀、无污染的细胞团作生产用种，将其转移到固体培养基上培养，注意剔出颜色发暗、发白的细胞团，接种的细胞团大小为 4-6mm，固体培养基为 N6 (配方见附表 2) 中添加 0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L 琼脂及 30g/L 蔗糖，pH 值 5.2-5.8；培养条件：温度 23-25℃，无光照培养，培养时间 30-35 天。

在利用生产用种进行大规模生产的同时，根据生产量大小，可以从中选择生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、呈团块状，质地均匀、略偏硬为特征的愈伤组织留种，再进行液体摇床培养制种，选种量不能超过总生产量的 15%，其余收集并低温真空干燥即得新疆紫草细胞培养物干品，如此反复。

此外上述方法中液体培养和固体培养可同期进行，这样可以将生产周期缩短为 15-20 天。在生产过程中还可以对培养物的草素及其衍生物 (β , β' -二甲基丙烯酰阿卡宁、去氧紫草素、消旋乙酰阿卡宁、乙酰阿卡宁、 β -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、消旋紫草素、 β -羟基异戊酰阿卡宁、1-甲氧基乙酰紫草素、乙酰紫草素等，均属 2,4-萘醌类有机化合物) 的含量进行考察，选择综合性状好的培养物留种。

本发明细胞系具有高含量的有效成分，可用于制备食品、化妆品、保健食品以及药品。

本发明细胞系可用于新疆紫草细胞培养物的大规模生产，不仅满足了临床需求，而且保护了国家珍稀植物野新疆紫草。

本发明的优点主要体现在：

(1) 本发明提供的细胞系紫草素及其衍生物含量高，紫草素及其衍生物含量占培养物干重的 8-10%，高效液相指纹图谱显示，培养物中所含成分与野生新疆紫草基本相同。(2) 生长旺盛，细胞生长速率可达 12-18g 干重/升/月，培养周期短，30-35 天。(3) 稳定性高，可

无限传代。(4) 通过本发明方法可进行大规模生产, 与野生型相比生产周期大大缩短, 并且所生产的培养物质量稳定产量高。(5) 本发明方法不占耕地, 不破坏新疆紫草野生资源, 保护了生态环境, 解决了新疆紫草资源短缺的问题。

具体实施方式

下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明, 但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下, 对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换, 均属于本发明的范围。

实施例1 新疆紫草细胞系的获得

取天然新疆紫草的种子, 先用 75%酒精浸泡 10-30s, 然后用 1%氯化汞溶液消毒 8-12min, 再用无菌水反复冲洗 4-5 次, 最后放在无菌滤纸上吸干种子表面水分, 用无菌镊子接种在基本 MS (配方见附表 1) 中添加, 10-30g/L 蔗糖、0.6g/L 琼脂的固体培养基上, 23-25℃无光照培养, 约 10 天种子即可萌发长出无菌苗。

取无菌胚芽做外植体, 在无菌条件下, 用无菌手术剪刀和无菌镊子将无菌苗根、茎、叶及子叶、胚芽切成 2-5mm 长的小段, 接种在 N6 (配方见附表 2) 中添加 0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L 琼脂及 30g/L 蔗糖的固体培养基上, 25℃暗培养, 10 天诱导出愈伤组织。

本发明通过对雪莲愈伤组织的诱导和培养得到了三种新疆雪莲细胞系: 白色系、黄色系和紫红色系; 对 3 种细胞系分别进行了继代培养, 通过对其生长速度、总黄酮化合物含量的检测, 确定紫红色细胞系为长势较好, 紫草素及其衍生物含量最高的细胞系。

选取紫红色细胞系为原始细胞系, 用目测法从固体培养基中挑选颜色较深、色彩鲜亮的紫红色愈伤组织在 N6 (配方见附表 2) 中添加 0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L 琼脂及 30g/L 蔗糖的固体培养基上继续继代培养。培养条件为 23-25℃, 无光照培养。为更好的优化种子、纯化细胞系, 继代时接种块大小控制在 3mm 以下。如此反复, 对所选择细胞系逐步驯化, 本发明经过近 100 代筛选获得了可以无限传代培养的稳定高产新疆紫草细胞系, 该细胞系生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色, 结构致密、呈团块状, 质地均一、容易分离; 其高效液相指纹图谱与野生紫草基本吻合, 并且紫草素及其衍生物的含量均高于野生新疆紫草; 紫草素及其衍生物的含量为细胞干重的 6-8%。

实施例2 液固交替生产方法

1、液体摇床培养制种

1.1 选种

选取培养20-25天, 长势较好, 颜色鲜艳, 呈紫红色, 颗粒均匀, 质地均一, 容易分离的本发明细胞系培养物作种子。

1.2 培养基配制

采用500ml培养瓶, 每瓶装120-150ml培养液, 培养液成分为N6 (配方见附表2) 中添加

0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、及30g/L蔗糖，pH值为5.2-5.8；高温灭菌：121℃，20min。

1.3 接种

无菌条件下，将培养物用镊子夹碎后接种到装有120-150ml培养液的500ml培养瓶中，接种量3-6% (W/V, g. fw/ml)。

1.4 摇床培养

培养条件：培养温度为22-27℃，摇床转速100-120 rpm，培养时间8-10d，如光照培养。

培养过程中，多观察，发现染菌立即挑出。

2、固体培养

2.1 液态种子的选取

用显微镜观察检测，选取颜色鲜艳、呈紫红色、长势较好、分散性好、颗粒均匀无污染的培养物作生产用种。

2.2 培养基

N6（配方见附表2）中添加0.2mg/L-0.5mg/L IAA、1mg/L-5mg/L KT、0.6g/L琼脂及30g/L蔗糖的固体培养基

2.3 接种

无菌条件下，将培养瓶中的培养液滤除，将培养物转移到垫有无菌滤纸的无菌培养皿中，挑取生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，分散性好、颗粒均匀、无污染的细胞团转接至固态培养基上，接种块大小为4-6mm。

2.4 固体培养

培养温度：23-25℃，无光照培养，培养周期：30-35天。

3 培养物的收集及循环生产

3.1 留种

大规模生产的同时，可以从中选择生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、呈团块状，质地均匀、略偏硬为特征的愈伤组织留种，用于步骤1的液体摇床培养，选种量不能超过总生产量的15%为宜。

3.2 培养物的收集

收集剩余培养物，低温真空干燥，即可。根据需要，可以将干燥的培养物磨成粗粉或细粉，或者用来提取紫草素及其衍生物活性成分。

经测定，用此方法进行的大规模生产成本较低，培养物生长速率快，产量可达20-25g干重/月/升培养基；干品培养物中紫草素及其衍生物含量高，达培养物干重的6-8%，并且培养物质量稳定。

以上给出了本发明较佳的实施方式，本领域技术人员很容易想到采用类似的方法对本发明的条件进行替换，例如将继代培养所用的激素替换成类似功能的激素，将所用的培养基替

换成类似功能的培养基，将培养条件作修改，然而，这些改动没有改变本发明的实质，因而均属于本发明的范围之内。

附表1 MS培养基配方

成分名称	分子式	分子量	MS (mg/L)	1/2MS (mg/L)
硝酸钾	KNO ₃	101.11	1900	950
硝酸铵	NH ₄ NO ₃	80.04	1650	825
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	136.09	170	85
硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	370	185
氯化钙	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	440	220
碘化钾	KI	166.01	0.83	0.83
硼酸	H ₃ BO ₃	61.83	6.2	6.2
硫酸锰	MnSO ₄ ·4H ₂ O	223.01	22.3	22.3
硫酸锌	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	8.6	8.6
钼酸钠	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.25	0.25
硫酸铜	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	0.025	0.025
氯化钴	CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	0.025	0.025
乙二胺四乙酸二钠	Na ₂ ·EDTA	372.25	37.3	37.3
硫酸亚铁	FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.03	27.8	27.8
肌醇			100	100
甘氨酸			2	2
盐酸硫胺素 (VB1)			0.1	0.1
盐酸吡哆醇 (VB6)			0.5	0.5
烟酸 (VB5 或 VPP)			0.5	0.5

附表2 N6培养基配方

成分名称	分子式	分子量	N6 (mg/L)
硝酸钾	KNO ₃	101.11	2380
硫酸铵	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.13	463
磷酸二氢钾	KH ₂ PO ₄	136.09	400
硫酸镁	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.47	185
氯化钙	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.02	166

碘化钾	KI	166.01	0.83
硼酸	H ₃ BO ₃	61.83	6.2
硫酸锰	MnSO ₄ ·4H ₂ O	223.01	22.3
硫酸锌	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	287.54	8.6
钼酸钠	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.25
硫酸铜	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	0.025
氯化钴	CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	0.025
乙二胺四乙酸二钠	Na ₂ ·EDTA	372.25	37.3
硫酸亚铁	FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.03	27.8
肌醇			100
盐酸硫胺素 (VB1)			0.1
盐酸吡哆醇 (VB6)			0.5
烟酸 (VB5 或 VPP)			0.5
