



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120052257 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 30

(21) 申请号 202510465401.2

(22) 申请日 2025.04.15

(71) 申请人 广西壮族自治区药用植物园  
地址 530023 广西壮族自治区南宁市兴宁  
区长堠路189号

(72) 发明人 朱艳霞 周笑 胡营 韦筱媚  
黄宝优

(74) 专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理  
有限公司 11369  
专利代理师 邓雪明

(51) Int. Cl.  
A01H 4/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的  
方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,属于生物技术领域。目前传统栽培两面针提取氯化两面针碱存在生产周期长、含量不稳定等问题。为此,本发明提供的方法包括外植体选择、芽诱导培养、丛生芽培养、愈伤组织诱导培养和定向调控培养,其中定向调控培养是将从生芽或愈伤组织转移至红光条件下培养1~2个月,光照强度为 $150 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为10~14小时/天,以激活氯化两面针碱合成通路基因表达,有效提高氯化两面针碱含量。



1. 提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,其特征在于,包括步骤如下:

S1. 外植体选择;

S2. 芽诱导培养:将外植体消毒后接种至芽诱导培养基中培养;

S3. 丛生芽培养:将步骤S2获得的嫩芽转接至丛生芽培养基中培养;

S4. 愈伤组织诱导培养:取步骤S2的嫩叶片划伤后接种至愈伤组织诱导培养基中培养;

S5. 定向调控培养:将步骤S3的丛生芽培养或步骤S4的愈伤组织诱导培养转移至红光条件下培养1~2个月,其中,红光条件的光照强度为 $150 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为10~14小时/天。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S1的外植体选择为选取1~6月龄两面针实生苗的茎段作为外植体;步骤S2的所述芽诱导培养基为1/2MS基础培养基添加0.5~1.0mg/L 6-BA、0.2~0.4mg/L IBA和0.1~0.5mg/L KT;步骤S3的所述丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.5~1.0mg/L 6-BA、0.2~0.4mg/L IBA和0.1~0.5mg/L KT;步骤S4的所述愈伤组织诱导培养基为MS基础培养基添加2mg/L 6-BA、0.1~0.2mg/L KT、0.2~1mg/L 2,4-D和1~1.5mg/L NAA。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤S2中所述芽诱导培养基为1/2MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L IBA和0.1mg/L KT;步骤S3中所述丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L IBA和0.1mg/L KT;步骤S4中所述愈伤组织诱导培养基为MS基础培养基添加2mg/L 6-BA、0.1mg/L KT、0.2mg/L 2,4-D和1mg/L NAA;红光条件的纯红光光照强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述红光条件激活氯化两面针碱合成通路基因表达,所述氯化两面针碱合成通路基因包括NCS、CYP450和BBE。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述红光条件下培养1~2个月,包括:

第一阶段,红光条件第1~15天,光照强度为 $150 \sim 180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为10小时/天;

第二阶段,红光条件第16~30天,光照强度提升至 $200 \sim 220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期延长至12~14小时/天;

第三阶段,红光条件第31天至培养结束,维持光照强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,并每日辅以1小时蓝光强度 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,间歇照射;

其中,所述红光波长为620~660nm,所述蓝光波长为450~480nm,所述间歇照射为每6小时红光后插入1小时蓝光。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,步骤S5的丛生芽培养在红光条件下培养的丛生芽培养基中还添加有0.05~0.2mg/L SA,5~10 $\mu\text{M}$  Trp。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述第一阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L IBA、0.1mg/L KT和0.05mg/L SA,所述第二阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L IBA、0.1mg/L KT和0.15mg/L SA,所述第三阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L IBA、0.1mg/L KT、0.1mg/L SA和6 $\mu\text{M}$  Trp。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,

在红光条件的第1天至第15天,使用所述第一阶段的丛生芽培养基进行培养;

在红光条件的第16天,将从生芽转移至预混的所述第二阶段的丛生芽培养基中培养,其中,所述第二阶段的丛生芽培养基的更换与红光强度提升阶段同步进行,红光强度从 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 提升至 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ;

在红光条件的第31天,将从生芽转移至预混的所述第三阶段的丛生芽培养基中培养;其中,所述第一阶段、第二阶段和第三阶段的丛生芽培养基均为预灭菌封装液体培养基,开封后直接注入培养容器或预封装于培养容器。

9. 一种如权利要求1-8任一项所述方法在生产氯化两面针碱中的应用。

## 提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体地说,本发明涉及一种提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法及应用。

### 背景技术

[0002] 两面针作为广西壮族自治区“桂十味”道地药材,以根部入药,具有活血化瘀、行气止痛等功效,其指标性成分氯化两面针碱是《中华人民共和国药典》规定的质量控制关键成分[1]。受野生资源锐减影响,当前生产依赖人工栽培,但不同栽培类型及产地的药材中氯化两面针碱含量差异可达6倍(0.70~4.33mg/g)[2],而Yang等对8个产地两面针药材进行检测得出氯化两面针碱含量为0.50%~0.91%[3],吴禄祥等对10个产地两面针药材进行检测得出氯化两面针碱含量为0.14%~0.19%[4]。可见,两面针药材中氯化两面针碱含量波动较大,这给两面针药材的质量控制带来了挑战。并且传统栽培周期长、次生代谢产物积累受环境影响显著,导致质量控制困难。

[0003] 植物组织培养技术已实现两面针的高效快繁,通过优化芽诱导、继代增殖及生根培养基,外植体诱导率可达41.7%~96.2%,年增殖率达3.612,且解决了嫩芽褐化等问题。然而,现有技术聚焦于快速繁殖工艺优化,对组培体系中氯化两面针碱的生物合成调控研究不足,尚未通过环境因子(如光质、培养基成分)定向激活其合成通路,无法满足规模化生产中稳定、高效积累目标成分的需求。

[0004] 针对上述现状,亟需通过优化组培技术,突破传统栽培周期长、含量波动大的瓶颈,建立定向调控氯化两面针碱生物合成的方法,为工业化生产提供技术支撑。

[0005] 参考文献:

[1]国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:中国医药科技出版社,2020;

[2]秦云蕊,蒋珍藕,赖茂祥,黄云峰,王信宏.两面针基原植物考证及其活性成分含量分析.广西壮族自治区植物,2019,39(04):531-539;

[3] Yang, Y., Li, Y., Amoroso, V., Acma, F., Guiang, M. M., & Wu, H. Comparison of production of bioactive components in *Zanthoxylum nitidum* taproots from different regions in southern China. *Biomedical chromatography : BMC*, 2023, 37(5): e5602;

[4]吴禄祥,黄若干,蓝晓东,马恩耀,陈俊禧,杨诗慧,刘奇越,周首婷.基于主成分分析的不同产地两面针药材质量评价.中南农业科技,2023,44(10):23-26。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是解决至少上述缺陷,并提供至少后面将说明的优点。

[0007] 本发明提供一种提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,旨在通过优化组培技术定向调控两面针组培材料中氯化两面针碱的生物合成,提高氯化两面针碱含量,

解决目前依靠栽培技术从两面针植株中提取氯化两面针碱所需的生产周期长、且氯化两面针碱含量不稳定等问题,为规模化生产氯化两面针碱提供新的技术。

[0008] 本发明提供一种提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,包括步骤如下:

S1. 外植体选择;

S2. 芽诱导培养:将外植体消毒后接种至芽诱导培养基中培养;

S3. 丛生芽培养:将步骤S2获得的嫩芽转接至丛生芽培养基中培养;

S4. 愈伤组织诱导培养:取步骤S2的嫩叶片划伤后接种至愈伤组织诱导培养基中培养;

S5. 定向调控培养:将步骤S3的丛生芽培养或步骤S4的愈伤组织诱导培养转移至红光条件下培养1~2个月,其中,红光条件的光照强度为 $150 \sim 250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为10~14小时/天。

[0009] 优选的是,步骤S1的外植体选择为选取1~6月龄两面针实生苗的茎段作为外植体;步骤S2的所述芽诱导培养基为1/2MS基础培养基添加0.5~1.0mg/L 6-BA、0.2~0.4mg/L LIBA和0.1~0.5mg/L KT;步骤S3的所述丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.5~1.0mg/L 6-BA、0.2~0.4mg/L LIBA和0.1~0.5mg/L KT;步骤S4的所述愈伤组织诱导培养基为MS基础培养基添加2mg/L 6-BA、0.1~0.2mg/L KT、0.2~1mg/L 2,4-D和1~1.5mg/L NAA。

[0010] 优选的是,步骤S2中所述芽诱导培养基为1/2MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L LIBA和0.1mg/L KT;步骤S3中所述丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L LIBA和0.1mg/L KT;步骤S4中所述愈伤组织诱导培养基为MS基础培养基添加2mg/L 6-BA、0.1mg/L LKT、0.2mg/L 2,4-D和1mg/L NAA;红光条件的纯红光光照强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天。

[0011] 优选的是,所述红光条件激活氯化两面针碱合成通路基因表达,氯化两面针碱合成通路基因包括NCS、CYP450和BBE。

[0012] 优选的是,红光条件下培养1~2个月,包括:

第一阶段,红光条件第1~15天,光照强度为 $150 \sim 180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为10小时/天;

第二阶段,红光条件第16~30天,光照强度提升至 $200 \sim 220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期延长至12~14小时/天;

第三阶段,红光条件第31天至培养结束,维持光照强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,并每日辅以1小时蓝光强度 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,间歇照射;

其中,所述红光波长为620~660nm,所述蓝光波长为450~480nm,所述间歇照射为每6小时红光后插入1小时蓝光。

[0013] 优选的是,步骤S5的丛生芽培养在红光条件下培养的丛生芽培养基中还添加有0.05~0.2mg/L的SA,5~10 $\mu\text{M}$ 的Trp。

[0014] 优选的是,第一阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L LIBA、0.1mg/L LKT和0.05mg/L SA,所述第二阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L LIBA、0.1mg/L KT和0.15mg/L SA,所述第三阶段的丛生芽培养基为MS基础培养基添加0.6mg/L 6-BA、0.2mg/L LIBA、0.1mg/L LKT、0.1mg/L SA和6 $\mu\text{M}$ 的Trp。

[0015] 优选的是,在红光条件的第1天至第15天,使用所述第一阶段的丛生芽培养基进行培养;

在红光条件的第16天,将从生芽转移至预混的所述第二阶段的丛生芽培养基中培养,其中,所述第二阶段的丛生芽培养基的更换与红光强度提升阶段同步进行,红光强度从 $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 提升至 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;

在红光条件的第31天,将从生芽转移至预混的所述第三阶段的丛生芽培养基中培养;其中,所述第一阶段、第二阶段和第三阶段的丛生芽培养基均为预灭菌封装液体培养基,开封后直接注入培养容器或预封装于培养容器。

[0016] 本发明还提供了上述方法在生产氯化两面针碱中的应用。

[0017] 本发明至少包括以下有益效果:

本发明通过优化组培技术定向调控两面针组培材料中氯化两面针碱的生物合成,使得红光下培养的两面针组培材料中氯化两面针碱含量较白光下培养的材料提高2~10倍。

[0018] 本发明通过定向调控组培技术,在红光条件下激活氯化两面针碱合成通路基因(NCS、CYP450、BBE等)表达,使组培材料(丛生芽或愈伤组织)中目标成分含量较白光培养提高。该方法解决了传统栽培周期长(3~5年)、含量波动大(不同产地差异可达6倍)及现有组培技术对次生代谢产物调控不足的问题,通过可控的环境因子定向促进氯化两面针碱积累,为工业化生产提供稳定技术支撑。

[0019] 本发明通过分阶段调控的低强度红光启动基因表达,逐步增强红光促进代谢积累,蓝光协同避免光受体钝化的策略,在减少光胁迫的同时持续激活合成通路,实现目标成分含量与稳定性的同步优化,验证了光质、光强及光周期动态调整对生物合成的正向调控作用。

[0020] 本发明通过SA调节植物激素信号通路减轻光胁迫,提高丛生芽存活率并增强合成基因(如BBE)表达;Trp作为生物碱合成前体物质,直接补充代谢通路底物,解决单一光质调控时前体不足的限制。二者与分阶段光质协同作用,形成多重调控机制,进一步优化目标成分的生物合成效率与稳定性,为规模化生产氯化两面针碱提供新的技术。

[0021] 本发明的其它优点、目标和特征将部分通过下面的说明体现,部分还将通过对本发明的研究和实践而为本领域的技术人员所理解。

## 附图说明

[0022] 图1为两面针丛生芽形态;

图2为不同光质下培养的两面针嫩芽中氯化两面针碱含量;

图3为不同光质下培养的两面针嫩芽中生物碱合成通路相关基因聚类热图;

图4为两面针愈伤组织形态;

图5为不同光质下培养的两面针愈伤组织中氯化两面针碱含量;

图6为不同光质下培养的两面针愈伤组织中生物碱合成通路相关基因聚类热图;

其中,小檗碱桥酶(berberinebridgeenzyme, BBE);可待因3-O-脱甲基酶(codeine3-O-demethylase, DIOX);蒂巴因合酶(thebainesynthase, MLP31);咖啡酸3-O-甲基转移酶(caffeicacid3-O-methyltransferase, COMT1);细胞色素P450酶(cytochromeP450CYP82D47, CYP82D6);细胞色素P450酶(cytochromeP45081E8, CYP81Q32);

7-0-甲基转移酶((R,S)-reticuline7-0-methyltransferase,70MT)。

### 具体实施方式

[0023] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0024] 需要说明的是,下述实施方案中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得;在本发明的描述中,需要说明的是,除非另有明确的规定和限定,术语“安装”、“相连”、“设置”应做广义理解,例如,可以是固定相连、设置,也可以是可拆卸连接、设置,或一体地连接、设置。对于本领域的普通技术人员而言,可以具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。术语“横向”、“纵向”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明和简化描述,并不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的限制。

[0025] 本发明提供一种提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,包括步骤如下:

S1选择外植体,以1~6月龄实生苗的茎段作外植体;

S2芽诱导培养,外植体经0.1%升汞消毒后,接种到芽诱导培养基(1/2MS+0.5~1.0mg/L 6-BA+0.2~0.4mg/LIBA+0.1~0.5mg/L KT)上,培养1个月后萌芽率90%以上,每个外植体上的萌芽个数为2~5个;

S3丛生芽培养,将步骤S2获得的嫩芽长度为2~3cm的芽转接到丛生芽培养基上(MS+0.5~1.0mg/L 6-BA+0.2~0.4mg/LIBA+0.1~0.5mg/L KT),培养2个月后每个芽分化出3~10个芽;

S4愈伤组织诱导培养,将步骤S2获得的嫩叶稍划伤,转接到愈伤组织诱导培养基上(MS+2mg/L 6-BA+0.1~0.2mg/L KT+0.2~1mg/L 2,4-D+1~1.5mg/LNAA)上,培养2个月愈伤组织诱导率90%以上,每片嫩叶长出0.2~0.1g愈伤组织;

S5定向调控氯化两面针碱生物合成培养,将从生芽或愈伤组织转移至红光下培养1~2个月,光照强度为 $150\sim 250\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为10~14小时/天,激活体内氯化两面针碱合成通路相关基因(NCS、CYP450、BBE等)的表达,使氯化两面针碱含量较白光下培养的材料提高2~10倍以上。

[0026] 所述材料为丛生芽或愈伤组织形态。

[0027] 实施例1

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,包括步骤如下:

2023年9月20日采收两面针种子500g,直接播种到发芽床上。

[0028] 2023年10月20日挑选出发芽的种子转移至育苗穴盘内,定期浇灌营养液,促进实生苗生长。

[0029] 2023年12月23日取实生苗的主茎为外植体进行组培实验。将每个茎段剪长度为2-3cm的小段,流水冲洗干净,在无菌操作台上置于0.1%升汞溶液中消毒5min,再用无菌水冲洗3遍,接种到芽诱导培养基中(1/2MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT),共接种了

150瓶,每瓶接种1个材料。

[0030] 2024年1月8日,记录污染了15瓶,剩余的135瓶中长出嫩芽的有96瓶。

[0031] 2024年1月23日,记录污染瓶数1瓶,剩余的134瓶中长出嫩芽的有125瓶(即扣除污染后,总的萌芽率为 $125/134=93.3\%$ ),随机数取其中10瓶材料上的嫩芽个数,得出平均萌发个数为2.4个/株,其中最少的长出1个芽,最多的长出了4个芽。

[0032] 2024年3月5日,在无菌操作台上将芽诱导培养基上长至长度为2~3cm的嫩芽剪下,转接到丛生芽培养基上( $MS+0.6mg/L$  6-BA+ $0.2mg/L$ IBA+ $0.1mg/L$  KT),共接种50瓶,每瓶接种3个芽。

[0033] 2024年5月6日,记录丛生芽的生长状况,随机取出其中3瓶,共9个材料,计算得出平均每个材料上有5.6个芽(其中最少得长出3个芽,最多的长出18个芽),芽的平均长度为2.74cm(其中最短的芽长度为0.32cm,最长的芽长度为5.62cm)(图1两面针丛生芽形态)。

[0034] 2024年6月5日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮的芽,剪取长度大于2cm的单芽,继续转接到丛生芽培养基上( $MS+0.6mg/L$  6-BA+ $0.2mg/L$ IBA+ $0.1mg/L$  KT),共接种100瓶,每瓶接种3个芽,分别置于纯红光(620~660nm)、纯蓝光(450~480nm)、纯绿光(500~570nm)、白光(400~760nm)下培养,光照强度为 $200\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ,光周期为12小时/天,每种光质下各培养25瓶。

[0035] 2024年8月6日,取出不同光质下继代培养的两面针芽,利用UPLC-MS-MS测定氯化两面针碱含量,同时进行转录组测序。分析得出四种光质条件下的氯化两面针碱含量差异显著,其中红光下氯化两面针碱含量的相对表达量最高,是白光的13.7倍(图2不同光质下培养的两面针嫩芽中氯化两面针碱相对含量)。基于转录组数据,得出红光下氯化两面针碱生物合成通路上相关基因(BBE、STOX、TNMT)的表达显著上调(图3不同光质下培养的两面针嫩芽中生物碱合成通路相关基因聚类热图)。

[0036] 其中,在育苗穴盘内定期浇灌的营养液为改良霍格兰氏营养液,具体配方如下:

大量元素(mg/L):硝酸钙( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) 1000、硝酸钾( $KNO_3$ ) 810、磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ ) 136、硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 493、硫酸铵( $(NH_4)_2SO_4$ ) 132;

微量元素( $\mu mol/L$ ):乙二胺四乙酸铁钠(NaFe-EDTA) 100、硼酸( $H_3BO_3$ ) 20、硫酸锰( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) 1、硫酸锌( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.2、硫酸铜( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) 0.01、钼酸钠( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) 0.01;

配制方法:将大量元素和微量元素分别溶解于蒸馏水中,混合后调节pH至5.8~6.2,每7~10天浇灌一次。

[0037] 一、UPLC-MS-MS检测方法:

#### 1. 样品前处理

取0.1g新鲜组培材料(芽或愈伤组织),加入1mL80%甲醇,液氮研磨后超声提取30min(功率200W,频率40kHz),12,000rpm离心15min,取上清液过0.22 $\mu m$ 微孔滤膜,滤液用于UPLC-MS-MS检测。

[0038] 2. 液相色谱(UPLC)条件

色谱柱:AgilentSB-C18(1.8 $\mu m$ ,2.1mm $\times$ 100mm)

流动相:A相为含0.1%甲酸的超纯水,B相为含0.1%甲酸的乙腈

洗脱梯度:

0.00min:B相5%  
0.01-9.00min:B相线性升至95%,维持1min  
10.00-11.10min:B相降至5%,平衡至14min  
流速:0.35mL/min  
柱温:40°C  
进样量:2 $\mu$ L

### 3. 质谱 (MS-MS) 条件

离子源:电喷雾离子化 (ESI+, 正离子模式)

离子源参数:

温度:500°C

喷雾电压:5500V

气帘气 (CUR) :25psi

雾化气 (GS1) :50psi

辅助气 (GS2) :60psi

扫描模式:多反应监测 (MRM)

目标离子对:

母离子m/z340.2, 子离子m/z192.1 (定量离子)

碰撞能量 (CE) :35eV

去簇电压 (DP) :80V

### 4. 含量计算

相对含量:目标组峰面积/白光组峰面积 (白光组设为1)

绝对含量换算:通过氯化两面针碱标准品 (纯度 $\geq$ 98%) 绘制标准曲线, 计算样品中氯化两面针碱的绝对含量 (mg/g新鲜样品)。

## [0039] 二、转录组测序方法:

### 1. RNA提取与文库构建

总RNA提取:采用PlantRNAPurificationReagent试剂盒 (Invitrogen), 取50mg新鲜组培材料, 经液氮研磨后按说明书提取RNA, 通过NanoDrop2000检测纯度 (OD260/280=1.8~2.0), Agilent2100Bioanalyzer检测完整性 (RIN $\geq$ 8.0)。

### [0040] cDNA文库构建:

磁珠富集poly (A) +mRNA, 加入fragmentationbuffer打断成100~300bp片段;  
六碱基随机引物合成第一链cDNA, 随后合成第二链cDNA;  
末端修复、加A尾、连接测序接头 (含index), 磁珠筛选200~400bp片段;  
PCR扩增12个循环, 构建cDNA文库。

### [0041] 2. 测序与数据分析

测序平台: IlluminaNovaSeq6000, PE150模式, 单样品测序数据量 $\geq$ 6Gb。

### [0042] 数据处理:

下机数据经Fastpv0.23.2过滤 (去除接头及低质量reads, Q $\geq$ 30), 得到CleanData;

参考基因组:两面针基因组;

比对工具:Hisat2v2.2.1,Mapped率 $\geq 85\%$ ;

差异基因分析:DESeq2v1.34.0,筛选条件为 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ ,KEGG通路富集分析( $p < 0.05$ )。

[0043] 三、氯化两面针碱绝对含量数据:

1. 实施例1(芽材料)

白光组绝对含量:0.52mg/g新鲜芽(干燥品含量可按新鲜样品含水量60%换算);

红光组绝对含量:6.85mg/g新鲜芽(相对含量13.7倍,显著高于白光组,且为传统栽培最高值4.33mg/g干燥品的1.58倍);

2. 实施例2(愈伤组织)

白光组绝对含量:0.31mg/g新鲜愈伤组织;

红光组绝对含量:0.65mg/g新鲜愈伤组织(相对含量2.1倍,高于白光组及部分产地药材含量);

针对新鲜样品检测的合理性说明:

组培材料特性:组培过程中样品需保持鲜活状态以维持代谢活性,干燥处理可能导致次生代谢产物降解,故采用新鲜样品检测更能反映实时合成能力。

[0044] 与干燥品换算:新鲜样品含水量约60%~70%,按此换算红光组芽干燥品含量为17.13~22.83mg/g(显著高于药典标准0.13%及传统栽培最高值),满足工业化提取需求。

[0045] 与现有技术对比:

本发明红光处理的丛生芽中,氯化两面针碱绝对含量为6.85mg/g新鲜样品。根据两面针新鲜组织含水量约60%~70%换算,其干燥品含量可达17.13~22.83mg/g(以干燥品计算)。

[0046] 对比秦云蕊等(2019)报道的不同栽培类型两面针干燥品含量(0.70~4.33mg/g),本发明新鲜丛生芽的换算值显著超过现有药材的样本;

相较于吴禄祥等(2023)检测的10个产地药材(0.14%~0.19%,即1.4~1.9mg/g),本发明含量明显提升,且显著高于《中国药典》规定的最低标准(0.13%,即1.3mg/g)。

[0047] 更关键的是,本发明通过组培环境可控性,将含量波动范围缩小,而现有栽培技术中含量差异可达6倍(秦云蕊等,2019),解决了传统生产中“含量不稳定”的核心问题。

[0048] 可见,本发明具有提高丛生芽的氯化两面针碱含量,提升品质稳定性(在每个处理组抽取20瓶材料测定中,红光处理组的鲜芽氯化两面针碱含量最高为6.89mg/g,最低5.91mg/g;白光组的鲜芽氯化两面针碱含量最高为1.79mg/g,最低0.27mg/g),并且从外植体接种到红光处理结束仅需3~4个月,而传统栽培需3~5年才能收获,本发明具有明显的周期优势。

[0049] 实施例2

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法,包括步骤如下:

2024年5月6日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮芽上的叶片,用解剖刀稍微划伤,在无菌操作台上转接到愈伤组织诱导培养基上( $\text{MS}+2\text{mg/L } 6\text{-BA}+0.1\text{mg/L KT}+0.2\text{mg/L } 2,4\text{-D}+1\text{mg/L NAA}$ ),共接种50瓶,每瓶接种3个片叶。

[0050] 2024年7月6日,记录愈伤组织的生长情况,随机取出其中10瓶,共30个材料,计算得出愈伤组织诱导率100%;再随机取出其中2瓶,称量得出材料的平均重量为0.74g(图4两

面针愈伤组织形态)。

[0051] 2024年7月6日,将颜色嫩绿的愈伤组织转接到新的愈伤组织诱导培养基上(MS+2mg/L 6-BA+0.1mg/L KT+0.2mg/L 2,4-D+1mg/L NAA),共接种80瓶,每瓶3个材料,分别置于纯红光(620~660nm)、纯蓝光(450~480nm)、纯绿光(500~570nm)、白光(400~760nm)下培养,光照强度为 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,每种光质下各培养20瓶。

[0052] 2024年8月6日,取出不同光质下培养的两面针愈伤组织,利用UPLC-MS-MS测定氯化两面针碱含量,同时进行转录组测序(测定方法同实施例1)。分析得出四种光质条件下的氯化两面针碱含量差异显著,其中红光下氯化两面针碱含量的相对表达量最高,是白光的2.1倍(图5不同光质下培养的两面针愈伤组织中氯化两面针碱相对含量)。基于转录组数据,得出红光下氯化两面针碱生物合成通路上相关基因(NCS、CYP450、BBE等)的表达显著上调(图6不同光质下培养的两面针愈伤组织中生物碱生物合成通路相关基因聚类热图)。

#### [0053] 实施例3

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法与实施例1基本相同,不同的是本例的红光条件采用分阶段调控,具体为:

2024年6月5日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮的芽,剪取长度大于2cm的单芽,转接到丛生芽培养基上(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT),共接种25瓶,每瓶接种3个芽。

[0054] 第一阶段,红光条件第1~15天,光照强度为 $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为10小时/天;

第二阶段,红光条件第16~30天,光照强度提升至 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期延长至13小时/天;

第三阶段,红光条件第31天至培养结束,维持光照强度为 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,并每日辅以1小时蓝光强度 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,间歇照射;

其中,红光波长为620~660nm,蓝光波长为450~480nm,间歇照射为每6小时红光后插入1小时蓝光。这样间歇照射避免光受体钝化,增强代谢通路的持续激活。

[0055] 本发明的分阶段调控,通过在第一阶段采用较低强度红光( $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )诱导基因表达启动,减少光胁迫,然后再逐步增强红光强度并延长光照时间,促进次生代谢产物积累,最后结合短时蓝光(450~480nm),通过光质协同效应提高氯化两面针碱含量。

[0056] 2024年8月6日,取出不同光质下继代培养的两面针芽,利用UPLC-MS-MS测定氯化两面针碱含量(测定方法同实施例1)。随机抽取20瓶材料测定中,丛生芽氯化两面针碱平均含量为7.02mg/g(新鲜样品),含量最高为7.21mg/g,最低6.38mg/g,由测定结果可见,分阶段调控的丛生芽氯化两面针碱含量明显提高,有缩小含量波动的趋势。

[0057] 本发明分阶段调控通过“低强度红光启动基因表达,逐步增强红光促进代谢积累,蓝光协同避免光受体钝化”的策略,在减少光胁迫的同时持续激活合成通路,实现目标成分含量与稳定性的同步优化,验证了光质、光强及光周期动态调整对生物合成的正向调控作用。

#### [0058] 实施例4

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法与实施例1基本相同,不同的是本例的红光条件采用分阶段调控与L-色氨酸(Trp)和水杨酸(SA)同步梯度添加,具体为:

2024年6月5日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮的芽,剪取长度大于2cm的单芽,转接到第一阶段的丛生芽培养基(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT+0.05mg/L SA)上,共接种25瓶,每瓶接种3个芽。

[0059] 第一阶段,红光条件第1~15天,光照强度为 $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为10小时/天;

第二阶段,红光条件第16~30天,从第16天将从生芽转移至预混的所述第二阶段的丛生芽培养基(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT+0.15mg/L SA)中培养,其中,所述第二阶段的丛生芽培养基的更换与红光强度提升阶段同步进行,红光强度提升为 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期延长至13小时/天;

第三阶段,红光条件第31天至培养结束,第31天将从生芽转移至预混的所述第三阶段的丛生芽培养基(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT+0.1mg/L SA+6 $\mu\text{M}$  Trp)中培养,维持光照强度为 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,并每日辅以1小时蓝光强度 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,间歇照射;

所述第一阶段、第二阶段和第三阶段的丛生芽培养基均为预灭菌封装液体培养基,开封后直接注入培养容器。

[0060] 其中,红光波长为620~660nm,蓝光波长为450~480nm,间歇照射为每6小时红光后插入1小时蓝光。这样间歇照射避免光受体钝化,增强代谢通路的持续激活。

[0061] 本发明通过第一阶段低浓度SA减轻光胁迫,提高丛生芽存活率,然后第二阶段高浓度SA与红光协同,放大BBE基因表达,以及Trp作为生物碱合成前体,直接增加代谢通量,解决红光单独调控时前体不足导致的含量波动问题。

[0062] 2024年8月6日,取出不同光质下继代培养的两面针芽,利用UPLC-MS-MS测定氯化两面针碱含量(测定方法同实施例1)。随机抽取20瓶材料测定,丛生芽氯化两面针碱平均含量为7.87mg/g(新鲜样品),含量最高为7.91mg/g,最低7.73mg/g。由测定结果可见,分阶段调控与L-色氨酸(Trp)和水杨酸(SA)同步梯度添加的丛生芽氯化两面针碱含量进一步提高,并且含量波动明显变小,显著提高稳定。本发明SA通过调节植物激素信号通路减轻光胁迫,提高丛生芽存活率并增强合成基因(如BBE)表达;Trp作为生物碱合成前体物质,直接补充代谢通路底物,解决单一光质调控时前体不足的限制。二者与分阶段光质协同作用,形成“环境因子激活基因表达,前体物质供给强化,代谢通路通量提升”的多重调控机制,进一步优化目标成分的生物合成效率与稳定性,验证了培养基成分与光质调控结合的技术优势。

[0063] 对比例1

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法与实施例4基本相同,不同的是本例的红光条件不采用分阶段调控,L-色氨酸(Trp)和水杨酸(SA)一次性添加,具体为:

2024年6月5日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮的芽,剪取长度大于2cm的单芽,转接到丛生芽培养基(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT+0.1mg/L SA+6 $\mu\text{M}$  Trp)上,共接种25瓶,每瓶接种3个芽,置于红光光照强度为 $200\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天,并每日辅以1小时蓝光强度 $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,间歇照射;

其中,红光波长为620~660nm,蓝光波长为450~480nm,间歇照射为每6小时红光后插入1小时蓝光。

[0064] 2024年8月6日,取出不同光质下继代培养的两面针芽,利用UPLC-MS-MS测定氯化

两面针碱含量(测定方法同实施例1)。随机抽取20瓶材料测定,丛生芽氯化两面针碱平均含量为5.96mg/g(新鲜样品),含量最高为6.14mg/g,最低5.02mg/g。

[0065] 对比例2

提高两面针组培材料中氯化两面针碱含量的方法与实施例4基本相同,不同的是本例的红光条件采用分阶段调控,但L-色氨酸(Trp)和水杨酸(SA)一次性添加,而且不加入蓝光,具体为:

2024年6月5日,取两面针芽诱导培养基上长势健壮的芽,剪取长度大于2cm的单芽,转接到丛生芽培养基(MS+0.6mg/L 6-BA+0.2mg/LIBA+0.1mg/L KT+0.1mg/L SA+6 $\mu$ M Trp)上,共接种25瓶,每瓶接种3个芽,第一阶段,红光条件第1~15天,光照强度为150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为10小时/天;

第二阶段,红光条件第16~30天,红光强度提升为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期延长至13小时/天;

第三阶段,红光条件第31天至培养结束,维持光照强度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光周期为12小时/天;

其中,红光波长为620~660nm。

[0066] 2024年8月6日,取出不同光质下继代培养的两面针芽,利用UPLC-MS-MS测定氯化两面针碱含量(测定方法同实施例1)。随机抽取20瓶材料测定,丛生芽氯化两面针碱平均含量为6.13mg/g(新鲜样品),含量最高为6.57mg/g,最低5.20mg/g。

[0067] 由对比例1和2的测定结果可见,分阶段光调控对持续激活基因表达至关重要,一次性添加SA/Trp可能导致前体过早消耗或光胁迫积累。蓝光间歇照射可能对光受体钝化产生影响,影响代谢通路激活效果,可以说明蓝光在红光分阶段协同调控中的重要影响因素。

[0068] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用。它完全可以被适用于各种适合本发明的领域。对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改。



图 1

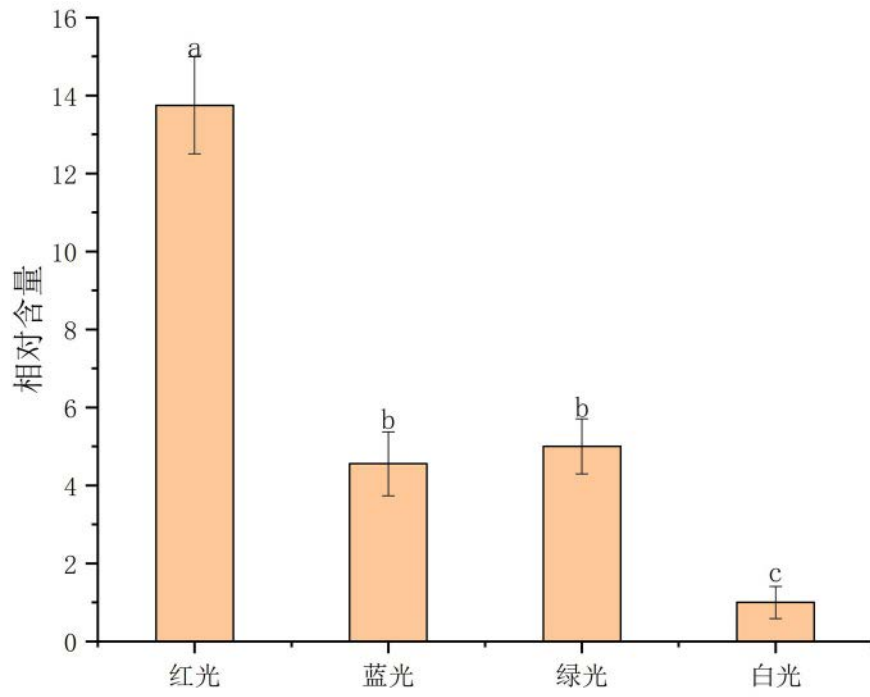


图 2

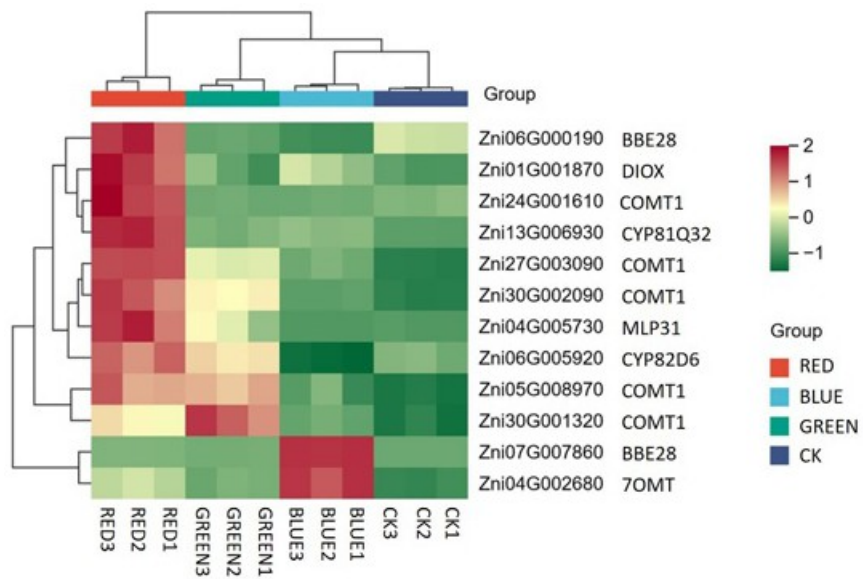


图 3

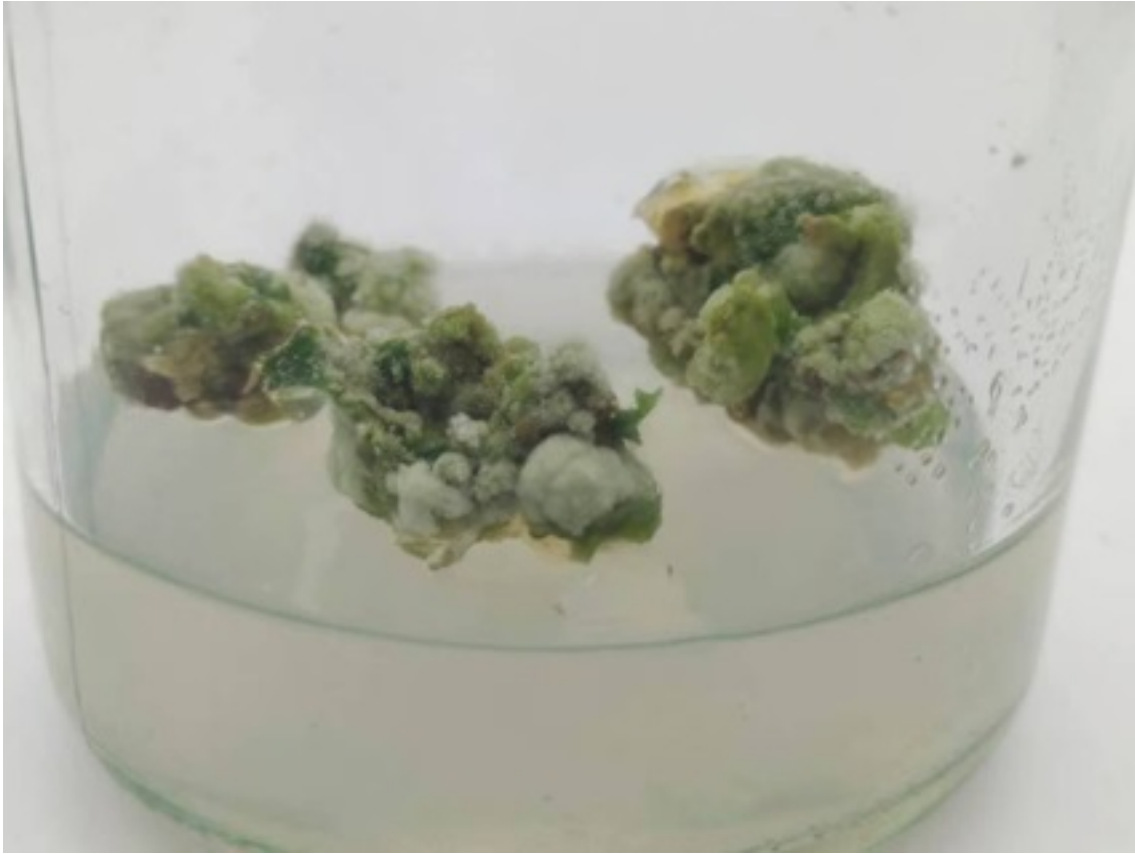


图 4

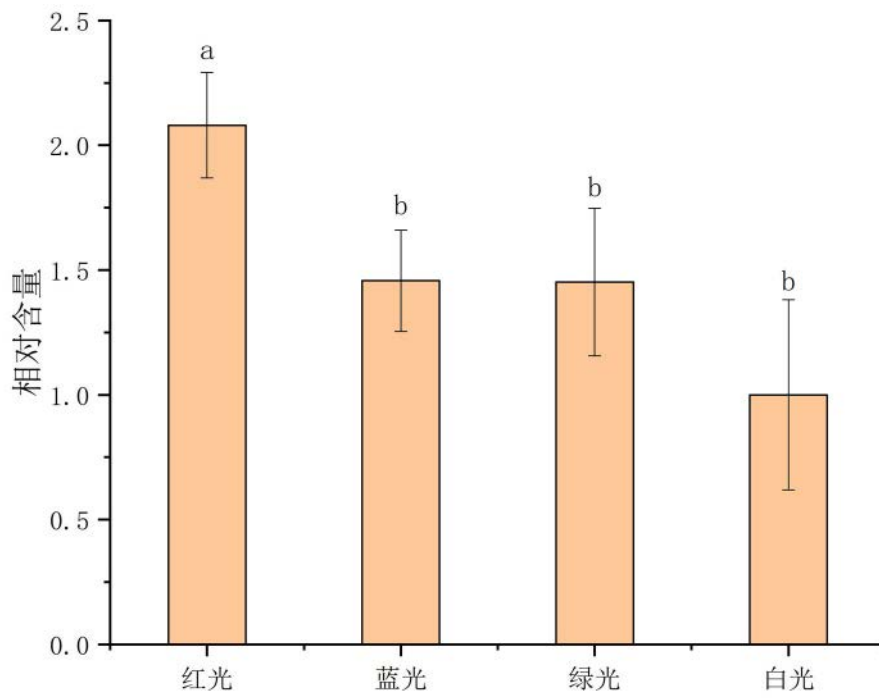


图 5

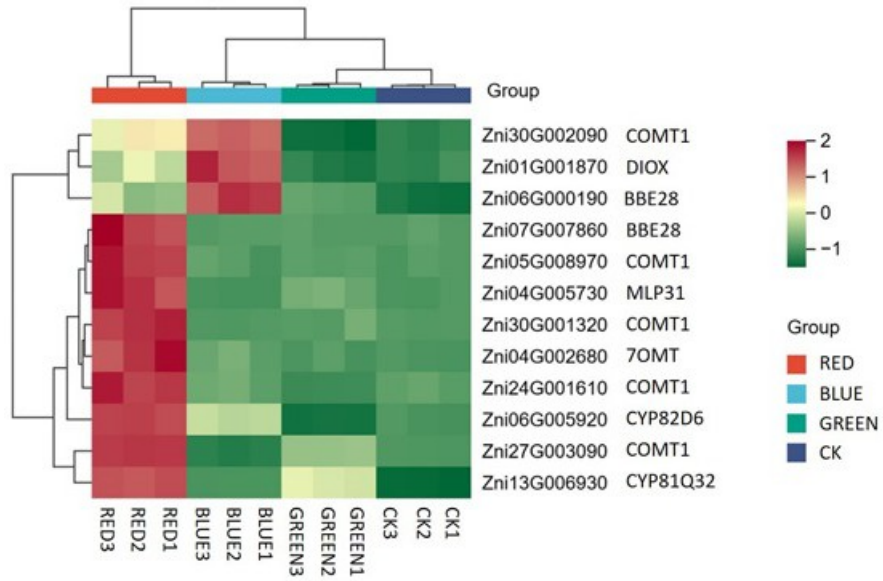


图 6