

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018 年 5 月 31 日 (31.05.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/095323 A1

(51) 国际专利分类号:

A01N 1/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/112299

(22) 国际申请日: 2017 年 11 月 22 日 (22.11.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201611041562.6 2016 年 11 月 22 日 (22.11.2016) CN

(71) 申请人: 华东理工大学(EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

(72) 发明人: 郭美锦(GUO, Meijin); 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 李佳瑞(LI,

Jiarui); 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 王泽建(WANG, Zejian); 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 陈雨霞(CHEN, Yuxia); 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。 庄英萍(ZHUANG, Yingping); 中国上海市梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司 (SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC); 中国上海市桂平路 435 号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,

(54) Title: APPLICATION OF LIVING CELL SENSOR IN CRYOPRESERVATION OF PLANT CELLS

(54) 发明名称: 活细胞传感仪在植物细胞低温保藏中的应用

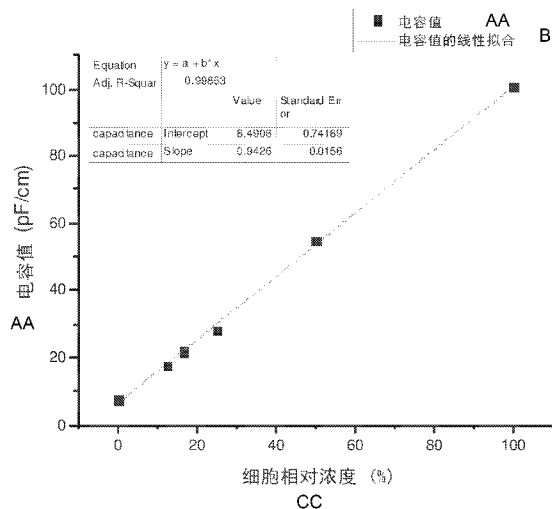


图 1

AA Capacitance value
BB Capacitance value linear fitting
CC Relative concentration of cells

(57) Abstract: The present invention relates to a use of a living cell sensor in cryopreservation of plant cells. For the first time, the live cell sensor is used to quickly evaluate the cryopreservation effect of cells. The effect of cryoprotectants on cell preservation is evaluated by changes of capacitance values of the living cell before and after cell freezing and resuscitation. Living cell electrodes provide a quick and accurate characterization of living cell concentrations. Combining the capacitance value of the living cell with a detection result of 2,3,4-triphenyltetrazolium chloride (TTC) can achieve rapid and quantitative evaluation of the effect of freezing method on



JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

cell preservation and overcome non-efficient and non-quantitative preservation of plant cells in the past. Compared with traditional methods, the method of the present invention can improve the cell cryogenic preservation comprehensive score by 5 times or more.

(57) 摘要: 本发明涉及活细胞传感仪在植物细胞低温保藏中的应用。首次将活细胞传感仪作为一种快速评价细胞冻存效果的方法, 通过细胞冷冻和复苏前后活细胞电容值的变化来评价冷冻保护剂对细胞保存的效果。采用活细胞电极则可以快速、准确地表征活细胞的浓度。将活细胞电容值与2,3,4-氯化三苯基四氮唑(TTC)的检测结果结合, 可达到快速定量评价冷冻方法对细胞保存的效果, 克服了以往植物细胞保藏方法的低效性和无定量性。本发明的方法与传统方法相比, 细胞低温保藏综合得分可以提高5倍或以上。

活细胞传感仪在植物细胞低温保藏中的应用

技术领域

本发明属于细胞检测领域，更具体地，本发明涉及活细胞传感仪在植物细胞低温保藏中的应用。

背景技术

现有的植物细胞系的保种主要通过以下两种方式。第一种是在生长培养基中进行继代保存，另一种则是对细胞进行低温冷冻保藏。通过长期继代而保存细胞存在费时费力、成本昂贵，并且会出现植物细胞特性消失等缺点。而细胞在超低温的条件下时，会停止内部的一系列代谢活动，并能够保持细胞自身的特性，大大降低细胞特性消失的风险。而植物细胞超低温保藏中，冷冻保藏的方法则对于细胞能够保存成功起到决定性作用。由于植物细胞中含有大量的水分，给冷冻保存带来困难。因此需要选择适合的冷冻保护剂，以及优化适合的冷冻保存方法，以最有效地控制细胞内含水以及冷冻过程中对细胞的损伤，以期可以在细胞冷冻保存后获得更高的细胞活性。

植物细胞在冷冻保藏过程中会由于内部或者外部水结成冰晶而造成细胞破裂，以往，均是采用细胞线粒体活性测定的方法来间接反映细胞在冷冻保藏后的活性情况。但是，这种测定操作烦琐，处理条件复杂，耗时长，在实际操作存在困难。

活细胞传感仪是利用电容法测量细胞溶液中的活细胞浓度。细胞溶液中存在的交变电场会使其中的离子发生迁移，而活细胞具有完整的绝缘性细胞膜，其中的离子受到束缚导致细胞膜极化，这使得细胞成为一个个微小的电容器。测量得到的电容值与溶液中的细胞量存在良好的线性关系。目前活细胞传感仪常被应用于发酵过程中测定发酵液中细胞量，尚未被应用于细胞冷冻保存中。

发明内容

本发明的目的在于提供活细胞传感仪在植物细胞低温保藏中的应用。

在本发明的第一方面，提供一种提高冷冻保存细胞的细胞活力的方法，所述方法包括：

(1) 用 0.15~0.3 M 蔗糖作为预处理剂对处于对数生长期的植物细胞进行预处理；

5 (2) 将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中，进行低温保存；所述的冷冻保护剂为 DMSO 和蔗糖，在培养基中的终浓度为：

DMSO：8~12%(w/v)；更佳地为 9~11%(w/v)；

蔗糖：8~12%(w/v)；更佳地为 9~11%(w/v)。

10 在一个优选例中，所述方法的步骤(1)中，还包括：对预处理后的细胞测定并记录电容值 A_1 ；

步骤(2)中，冷冻保存后，还包括：对植物细胞进行细胞复苏，利用活细胞传感仪测定并记录电容值 A_2 ；

以细胞的基础电容值为 A_3 ；以式(I)获得细胞活力保存率：

$$\text{细胞活力保存率} = (A_2 - A_1) / (A_3 - A_1) \quad (I);$$

15 根据获得的细胞活力保存率，评价植物细胞的细胞活力。

在另一优选例中，所述的植物细胞是罗汉果植物细胞；更佳地是罗汉果愈伤组织细胞。

在另一优选例中，所述方法的步骤(1)中，所述的蔗糖存在于液体培养基中，将处于对数生长期的植物细胞加入到液体培养基中，进行预处理。

20 在另一优选例中，所述的方法的步骤(1)中，以蔗糖作为预处理剂时，所述的蔗糖的浓度为 0.18~0.22 M；更佳地为 0.2 M。

在另一优选例中，所述方法中，进行预处理的时间为 1~46 小时，更佳地 5~22 小时，更佳地 8-10 小时；预处理的温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ；预处理的转速为： $110 \pm 20 \text{ rpm}$ ，更佳地 $110 \pm 10 \text{ rpm}$ 。

25 在另一优选例中，所述的低温保存是冻存。

在另一优选例中，所述方法的步骤(1)后，还包括：分离经过预处理的细胞；更佳地，通过离心分离预处理的细胞；或

步骤(2)中，将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中后，进行低温保存的

步骤包括：

(i) 细胞孵育：在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ ， $110\pm 20\text{ rpm}$ ，较佳地 $110\pm 10\text{ rpm}$ 条件下孵育 $45\pm 10\text{ min}$ ，较佳地 $45\pm 5\text{ min}$ ；

(ii) 先在 $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下保存 $40\pm 10\text{ min}$ ，较佳地 $40\pm 5\text{ min}$ ，再放到 $-80^{\circ}\text{C}\pm 10^{\circ}\text{C}$ ，较佳地 $-80^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。

在另一优选例中，所述方法中，所述的培养基含有：MS 培养基， $30\pm 5\text{ g/L}$ 蔗糖， $1.0\pm 0.2\text{ mg/L}$ 6-BA， $0.5\pm 0.1\text{ mg/L}$ NAA+ $100\pm 10\text{ mg/L}$ 肌醇。较佳地，所述的培养基为液体培养基。

10 在本发明的另一方面，提供一种快速评价植物细胞的细胞活力的方法，所述方法包括：

(a) 将植物细胞进行冷冻保存；冷冻保存前测定并记录电容值 A_1 ；

(b) 冷冻保存后，对植物细胞进行细胞复苏，利用活细胞传感仪测定并记录电容值 A_2 ；

15 (c) 以细胞的基础电容值为 A_3 ；以式(I)获得细胞活力保存率：

$$\text{细胞活力保存率}=(A_2-A_1)/(A_3-A_1) \quad (\text{I});$$

(d) 根据(c)获得的细胞活力保存率，评价植物细胞的细胞活力。

在一个优选例中，所述的植物细胞是罗汉果愈伤组织细胞。

在另一优选例中，细胞活力保存率越高，则细胞活力越好。例如，所述的
20 细胞活力保存率高于 30%，高于 40%，高于 50%或更高。

在另一优选例中，在如上确定细胞活力保存率的同时，还结合考虑 2,3,4-氯化三苯基四氮唑(TTC)的检测结果。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。
25

附图说明

图 1、活细胞电容值与细胞浓度的线性关系。

具体实施方式

本发明人首次将活细胞传感仪(Viable Cell Monitor)作为一种快速评价细胞冻存效果的工具，通过细胞冷冻和复苏前后活细胞电容值的变化来评价冷冻保护剂对细胞保存的效果。采用活细胞电极则可以快速、准确地表征活细胞的浓度，将活细胞电容值与 TTC 的检测结果结合起来，就可以快速评价冷冻方法对细胞保存的效果。

并且，根据应用活细胞传感仪的测定及分析，本发明人优化了植物细胞的冷冻保存方法，找到了最佳的进行冷冻保存的条件和方法。

活细胞传感仪应用于低温冷藏细胞评估

现有的评价细胞低温保藏后细胞活率的方法主要是通过恢复生长、TTC 值测定等方法。恢复生长法是通过将细胞复苏后，使其恢复生长统计细胞活率，但是植物细胞恢复生长需要一个较长的周期，一般三周以上，某些细胞甚至长达 2 个月，这使得植物细胞最优化保藏方法的建立需要耗费很长的时间。而 TTC 方法则主要是利用细胞内脱氢酶还原成红色的甲臢类物质使细胞显色，用于检测细胞内线粒体的活性，但是这种方法难于区分在冷冻保藏过程中由于细胞膜的破损等而死亡的细胞，造成测定数据的不可靠性大幅度增加。

现有的评价细胞低温保藏的方法耗时太长，敏感性比较低，不利于细胞保存方法的建立。本发明利用活细胞传感仪，能够对植物细胞低温保藏前后的活细胞电容值进行检测，从而获得的低温保藏方法对植物细胞低温保藏后的活力保存率。可以将细胞冻存方法中的预处理剂种类、预处理时间和冷冻保护剂的种类进行快速的筛选，通过快速地对细胞冷冻方法进行评估，提高植物细胞低温保藏后的存活率，操作简单，同时缩短了时间，提高效率。所述的活细胞传感仪例如 Aber 公司的 2801-00 或 220 型。

植物细胞低温冷藏方法的优化

利用前述建立的活细胞传感仪测定植物细胞低温冷藏后活性的方法，本发明人进行了植物细胞冷藏方法的多方面优化，包括冷冻保护剂、冷冻条件。操作程序等。

现有的渗透性冷冻保护剂，包括一类可以渗透到细胞内，一般是一些小分子物质，主要包括甘油、DMSO、乙二醇、丙二醇、乙酰胺、甲醇等；以及一类非渗透性冷冻保护剂，它们不能渗透到细胞内，一般是些大分子物质，主要包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、蔗糖、聚乙二醇、葡聚糖、白蛋白以及羟乙基淀粉等。

将渗透和非渗透性冷冻保护剂混合使用，除了可以对细胞起到脱水的作用，可以较好的控制细胞内外冰晶的形成以及冰晶的形状，防止有尖的冰晶生成并刺伤细胞，从而对细胞起到保护的作用。因此，本发明人经过反复研究，选择液体培养基+DMSO+蔗糖、同时含有渗透和非渗透性冷冻保护剂的制剂，应用于进行植物细胞的低温冷藏保护。

在本发明的实施例中，本发明人采用活细胞传感仪进行罗汉果愈伤组织细胞快速低温冷冻保藏过程中细胞存活率的快速评价体系，本发明利用活细胞传感仪，对细胞低温保藏前后的活细胞电容值进行检测，从而快速得到低温保藏方法后活细胞存活率，实现在较短的时间内对特定保藏方法的效果进行评价，从而能够较快的建立植物细胞的低温保藏方法，缩短时间，提高效率。

基于本发明人的新发现，提供一种提高冷冻保存细胞的细胞活力的方法，所述方法包括：(1) 用 0.15~0.3 M 蔗糖作为预处理剂对处于对数生长期的植物细胞进行预处理；(2) 将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中，进行低温保存；所述的冷冻保护剂为 DMSO 和蔗糖，在培养基中的终浓度为：DMSO：8~12%(w/v)；蔗糖：8~12%(w/v)；更佳地，在培养基中的终浓度为：DMSO：9~11%(w/v)；蔗糖：9~11%(w/v)。

在冷冻处理过程，可以进行细胞活力的测定，以随时了解到细胞活性的变化。因此，步骤(1)中，还包括：对预处理后的细胞测定并记录电容值 A_1 ；步骤(2)中，冷冻保存后，还包括：对植物细胞进行细胞复苏，利用活细胞传感仪(Viable Cell Monitor)测定并记录电容值 A_2 ；以细胞的基础电容值为 A_3 ；以式(I)获得细胞活力保存率：

$$\text{细胞活力保存率} = (A_2 - A_1) / (A_3 - A_1) \quad (I);$$

根据获得的细胞活力保存率，评价植物细胞的细胞活力。

本发明的植物细胞可以是多种植物细胞，包括它们的愈伤组织细胞。作为

本发明的优选方式，所述的植物细胞是罗汉果细胞；较佳地是罗汉果愈伤组织细胞。

本发明人经过测定分析，优化了预处理的方法。将所述的蔗糖存在于液体培养基中，将处于对数生长期的植物细胞加入到液体培养基中，进行预处理。

- 5 较佳地，预处理时，所述的蔗糖的浓度为 0.18~0.22 M；更佳地为 0.2 M。较佳地，在预处理后，还包括：分离经过预处理的细胞；更佳地，通过离心分离预处理的细胞

本发明人还分析了预处理的时间，结果发现，预处理的时间为 1~46 小时，较佳地 5~22 小时，更佳地 8-10 小时是较为理想的。

- 10 作为本发明的优选方式，预处理的温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ；预处理的转速为： $110 \pm 20 \text{ rpm}$ ，较佳地 $110 \pm 10 \text{ rpm}$ 。

- 作为本发明的优选方式，将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中后，进行低温保存的步骤包括：(i) 细胞孵育：在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ ， $110 \pm 20 \text{ rpm}$ (较佳地 $110 \pm 10 \text{ rpm}$) 条件下孵育 $45 \pm 10 \text{ min}$ (较佳地 $45 \pm 5 \text{ min}$)；(ii) 先在 $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ 下保存
15 $40 \pm 10 \text{ min}$ (较佳地 $40 \pm 5 \text{ min}$)，再放到 $-80^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ (较佳地 $-80^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$) 保存。

- 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，
20 科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

1.1 菌种和培养基

- 菌种：罗汉果悬浮细胞：选取罗汉果的种胚，诱导出胚性松散的愈伤组织，经过继代和筛选获得生长状态良好、均匀的愈伤组织，将其接种到液体培养基
25 中进行悬浮培养，获得状态均一的悬浮细胞系。

半固体培养基：MS 培养基 + 30g/L 蔗糖 + 1.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 100mg/L 肌醇 + 4.6g/L 琼脂。

液体培养基：MS 培养基 + 30g/L 蔗糖 + 1.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA + 100mg/L 肌醇。

预处理液：液体培养基+蔗糖(0.2~0.5M)/海藻糖(0.2~0.5M)。

含有冷冻保护剂的培养基：液体培养基+DMSO(5%~10%)+蔗糖(5%~10%)/山梨醇(5%~10%)。

5 1.2 仪器和试剂

仪器：活细胞传感仪(活细胞浓度分析仪，获自 Aber 公司：2801-00)、-80℃超低温冰箱、旋转式摇床。

试剂：DMSO(二甲基亚砷)、蔗糖、山梨醇、海藻糖：上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

10

1.3 细胞的超低温保藏方法

1.3.1 预处理

取一定量处于对数生长期的细胞进行离心(或沉降)，去掉上清后，加入等量的预处理液。在 25℃，110rpm 的条件下预处理 18h。

15

1.3.2 孵育

将预处理过的细胞进行离心，去掉上清后，加入冷冻保护剂，在 0~4℃，110rpm 条件下孵育 45min。

20 1.3.3 冷冻

将孵育后的细胞先在-20℃降温 40min，再放到-80℃超低温冰箱降温。

1.3.4 复苏

25 将冷冻过的细胞在 39℃的水浴条件下进行化冻，一般 2-3min 为宜。至离心管中的冰完全溶解后，离心后迅速将具有一定毒性的冷冻保护剂去掉，用预处理液清洗三次。

1.4 测定方法

(1)细胞活力评价方法

悬浮细胞混匀后用活细胞传感仪测定活细胞电容值。预处理后的细胞的活细胞电容值记为 A_1 ，复苏后的活细胞电容值记为 A_2 ，细胞的基础电容值记为 A_3 (细胞完全死亡的电容值)。细胞活力保存率 $= (A_2 - A_1) / (A_3 - A_1)$ 。

细胞的基础电容值：将细胞悬液放在沸水中煮沸 1h 后，再超声破碎 40min，测的电容值为基础电容值。

(2) 细胞线粒体活性测定

悬浮细胞经 $8\mu\text{m}$ 滤膜抽滤后，取 100mg 鲜重细胞，分别加入 2.5mL 0.4% 的 2,3,4-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 溶液和 2.5mL 0.05mol/L (pH 7.5) 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 的磷酸缓冲液，混匀后 25°C 暗处理 16h。暗培养后离心去上清液，蒸馏水洗涤 3 次，加入 4mL 甲醇，置于 60°C 水浴 50min，期间用枪头轻轻吹打两次，至细胞脱至无色。室温静置后，4000rpm 离心 5min 后取上清液，在 485nm 下测定吸光度，间接反映细胞活力。

15 实施例 1、活细胞电容值与细胞浓度的线性关系

以对数生长期的细胞作为初始细胞，分别将细胞稀释 2、4、6、8 倍后，利用活细胞传感仪测定电容值。

结果如图 1，从图 1 可以看出，活细胞电容值与细胞浓度具有很好的线性关系。对数生长期的细胞电容值在 100 pF/cm 左右，而只有培养基的溶液中存在一个基础电容值在 7 pF/cm 左右，将细胞完全致死，电容值与培养基基础电容值相差不大，这个在后续的实验中也得到了证明。

从图 1 的结果可以得出结论，活细胞电容值能够很好地表征活细胞浓度，这也为后续的实验提供了基础。

25 实施例 2、不同类型的冷冻保护剂对细胞低温保藏的影响

已经被用作冷冻保护剂的有甘油、DMSO、蔗糖、山梨醇等。其中，甘油和 DMSO 为渗透性冷冻保护剂，蔗糖和山梨醇是非渗透性冷冻保护剂。本实施例中探讨如何选择冷冻保护剂，选择怎样的浓度可以获得最为优异的保护效果。

采用不同浓度的 DMSO (5%、10%) 分别和蔗糖 (5%、10%)、山梨醇 (5%、10%)

进行混合作为冷冻保护剂进行研究，将细胞用含有 0.35M 蔗糖的液体培养基进行预处理 18h 后，将预处理过的细胞进行离心，去掉上清后，加入冷冻保护剂，在 0~4℃，110rpm 条件下孵育 45min。将孵育后的细胞先在 -20℃ 降温 40min，再放到 -80℃ 超低温冰箱降温 24h 后，测定细胞经过低温保藏后的活力。分组情况如表 1，其中 9 组是经过预处理但是不加冷冻保护剂的细胞。

冷冻保护剂对细胞低温保藏活力的影响结果如表 1。

表 1、冷冻保护剂对细胞低温保藏活力的影响

组	DMSO	蔗糖	山梨醇	A1 pF/cm	A2 pF/cm	A3 pF/cm	活力 保存率	TTC 值/ 100mg 细胞
1	5%	5%	0	31.64	15.54	8.62	30.06%	0.339
2	5%	10%	0	31.79	19.04	8.64	44.92%	0.835
3	10%	5%	0	32.41	16.47	8.89	32.23%	0.672
4	10%	10%	0	30.35	17.55	8.64	41.04%	0.859
5	5%	0	5%	27.99	14.25	8.62	29.07%	0.612
6	5%	0	10%	31.13	17.64	8.82	39.53%	0.746
7	10%	0	5%	31.75	16.49	8.86	33.33%	0.691
8	10%	0	10%	31.43	18.27	8.83	41.77%	0.945
9	0	0	0	33.95	11.24	7.95	12.65%	0.187

从实验结果可以看出，不管是在活细胞电容值还是细胞线粒体活性上来看，加入冷冻保护剂的细胞活性都远远高于不添加冷冻保护剂的细胞。从活细胞电容值水平上，细胞活力保存率较对照组都有很大的提高。而且活细胞电容值和 TTC 值也有一个较好的对应关系。因此，细胞活力保存率可以反应细胞在冻存后的活力情况。

将 DMSO、蔗糖、山梨醇各个水平下活细胞电容值和 TTC 值进行统计分析，并将各个水平下的 TTC 值和活细胞电容值进行综合评分。各水平冷冻保护剂对细胞低温保藏后活性的影响结果见表 2。

表 2、各水平冷冻保护剂对细胞低温保藏后活性的影响

冷冻保护剂	活力保存率得分	TTC 值得分	综合得分
5%蔗糖	31.15%	0.506	13.215
10%蔗糖	42.98%	0.847	20.000
5%山梨醇	31.20%	0.652	14.951
10%山梨醇	40.65%	0.846	19.441
5%DMSO	35.90%	0.633	15.825
10%DMSO	37.09%	0.792	17.978

注：TTC 值得分=TTC 值/最大 TTC 值×10；

活力保存率得分=活力保存率/最大活力保存率×10；

综合得分= TTC 值得分+活力保存率得分。

5

从表 2 的结果可以看出，10%含量的 DMSO 对细胞低温保藏后的效果要优于 5% DMSO。而对于山梨醇和蔗糖，不管是活细胞电容值还是 TTC 值，10%的含量对于细胞低温保藏的效果都是最好的。

经过综合评分，确定对细胞低温保藏较好的冷冻保护剂成分为：细胞生长
10 培养基(液体培养基)+10%DMSO+10%蔗糖，与经过预处理但是不加冷冻保护剂的细胞相比，此条件下细胞的活力保存率和线粒体活性(TTC 值)分别提高了 224.43%、372.16%。

实施例 3、不同类型的预处理剂对细胞低温保藏的影响

15 预处理剂的种类以及预处理剂的浓度不同，对于细胞低温保藏也有影响，预处理剂浓度过高时，虽然脱水效果比较好，但是高浓度的预处理剂对细胞的损伤也比较大。在前面实验的基础上，选择蔗糖 0.2M、0.35M、0.5M 以及海藻糖 0.2M、0.35M、0.5M 进行考察，对照是不进行预处理，直接进行冻存的细胞。
20 冻存时间均为：-20℃放置 40min 后，放入-80℃进行保存 24h；冻存培养基均为：细胞生长培养基(液体培养基)+10%DMSO+10%蔗糖；之后进行复苏测定。

实验结果见表 3。

表 3、预处理剂种类及浓度对细胞低温保藏后活性的影响

组	预处理剂	A1	A2	A3	活力	TTC 值/	综合
---	------	----	----	----	----	--------	----

		pF/cm	pF/cm	pF/cm	保存率	100mg 细胞	评分
1	蔗糖 0.2M	42.25	26.44	10.00	50.98%	0.916	20.000
2	蔗糖 0.35M	30.55	17.01	8.49	38.62%	0.479	12.805
3	蔗糖 0.5M	24.62	11.81	6.03	31.09%	0.232	8.632
4	海藻糖 0.2M	41.05	23.40	7.77	46.97%	0.767	17.586
5	海藻糖 0.35M	34.06	18.80	7.09	43.42%	0.841	17.698
6	海藻糖 0.5M	21.20	10.65	5.50	32.80%	0.224	8.880
7	对照	54.85	29.40	12.81	39.46%	0.670	15.055

注：TTC 值得分=TTC 值/最大 TTC 值*10，活力保存率得分=活力保存率/最大活力保存率*10，综合得分= TTC 值得分+活力保存率得分。

实验结果表明，以细胞生长培养基(液体培养基)+10%DMSO+10%蔗糖作为
5 冷冻保护剂，细胞经过蔗糖 0.2M 预处理剂预处理后进行超低温保藏，与对照相比，细胞的活力保存率和线粒体活性(TTC 值)均有大幅度的提高，活力保存率和细胞活性分别提高了 29.18.%、36.72%。

实施例 4、预处理时间对细胞低温保藏的影响

10 预处理时间对细胞冷冻保藏后活性的影响与预处理剂的浓度原理相似，若细胞在具有一定渗透压的环境下处理时间过长时，有可能造成细胞的过度失水，这样就造成细胞在预处理阶段的活性大大降低，从而影响细胞冻存复苏后的活性。在前面实验的基础上，以蔗糖 0.2M 为预处理剂，对预处理时间 0h、1h、2h、5h、9h、22h、46h 进行考察。冻存条件为：-20℃放置 40min 后，放入-80
15 ℃进行保存 24h；冻存培养基均为：液体培养基+10%DMSO+10%蔗糖，之后进

行复苏测定。

实验结果见 4。

表 4、预处理时间对细胞低温保藏后活性的影响

组	预处理 时间	A1 pF/cm	A2 pF/cm	A3 pF/cm	活力 保存率	TTC 值 /100mg 细胞	综合 评分
1	0h	64.41	12.42	8.26	7.41%	0.033	3.282
2	1h	62.11	14.46	8.41	11.27%	0.195	8.843
3	2h	61.68	15.63	8.78	12.94%	0.201	9.547
4	5h	61.19	21.21	11.09	20.20%	0.225	12.540
5	9h	58.51	25.85	11.3	30.81%	0.376	20.000
6	22h	56.48	22.86	10.43	26.99%	0.319	17.245
7	46h	45.92	14.60	10.94	10.45%	0.106	6.213

5 实验结果表明，以细胞生长培养基(液体培养基)+10%DMSO+10%蔗糖作为冷冻保护剂，细胞经过蔗糖 0.2M 预处理剂预处理 9-22h 小时后进行超低温保藏、保存效果相对理想，其中以 9h 后进行超低温保藏、细胞保存效果最好，与对照(预处理 0h)相比，细胞的活力保存率和线粒体活性(TTC 值)均有大幅度的提高。

10

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

15

权 利 要 求

1. 一种提高冷冻保存细胞的细胞活力的方法，其特征在于，所述方法包括：

5 (1) 用 0.15~0.3 M 蔗糖作为预处理剂对处于对数生长期的植物细胞进行预处理；

(2) 将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中，进行低温保存；所述的冷冻保护剂为 DMSO 和蔗糖，在培养基中的终浓度为：

DMSO：8~12%(w/v)；

蔗糖：8~12%(w/v)。

10

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(1)中，还包括：对预处理后的细胞测定并记录电容值 A_1 ；

步骤(2)中，冷冻保存后，还包括：对植物细胞进行细胞复苏，利用活细胞传感仪测定并记录电容值 A_2 ；

15 以细胞的基础电容值为 A_3 ；以式(I)获得细胞活力保存率：

$$\text{细胞活力保存率} = (A_2 - A_1) / (A_3 - A_1) \quad (\text{I});$$

根据获得的细胞活力保存率，评价植物细胞的细胞活力。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的植物细胞是罗汉果植物
20 细胞；较佳地是罗汉果愈伤组织细胞。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(1)中，所述的蔗糖存在于液体培养基中，将处于对数生长期的植物细胞加入到液体培养基中，进行预处理。

25

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(1)中，以蔗糖作为预处理剂时，所述的蔗糖的浓度为 0.18~0.22 M；更佳地为 0.2 M。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，进行预处理的时间为 1~46 小
30 时，较佳地 5~22 小时，更佳地 8-10 小时；预处理的温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ；预处

理的转速为：110±20 rpm。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，步骤(1)后，还包括：分离经过预处理的细胞；较佳地，通过离心分离预处理的细胞；或

5 步骤(2)中，将细胞加入到含有冷冻保护剂的培养基中后，进行低温保存的步骤包括：

(i) 细胞孵育：在 0~4℃，110±20 rpm 条件下孵育 45±10 min；

(ii) 先在-20±2℃下保存 40±10 min，再放到-80℃±10℃保存。

10 8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的培养基含有：MS 培养基，30±5 g/L 蔗糖，1.0±0.2 mg/L 6-BA，0.5±0.1 mg/L NAA+100±10 mg/L 肌醇。

9. 一种快速评价植物细胞的细胞活力的方法，其特征在于，所述方法包括：

15 (a) 将植物细胞进行冷冻保存；冷冻保存前测定并记录电容值 A_1 ；

(b) 冷冻保存后，对植物细胞进行细胞复苏，利用活细胞传感仪测定并记录电容值 A_2 ；

(c) 以细胞的基础电容值为 A_3 ；以式(I)获得细胞活力保存率：

$$\text{细胞活力保存率} = (A_2 - A_1) / (A_3 - A_1) \quad (\text{I});$$

20 (d) 根据(c)获得的细胞活力保存率，评价植物细胞的细胞活力。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，细胞活力保存率越高，则细胞活力越好。

25

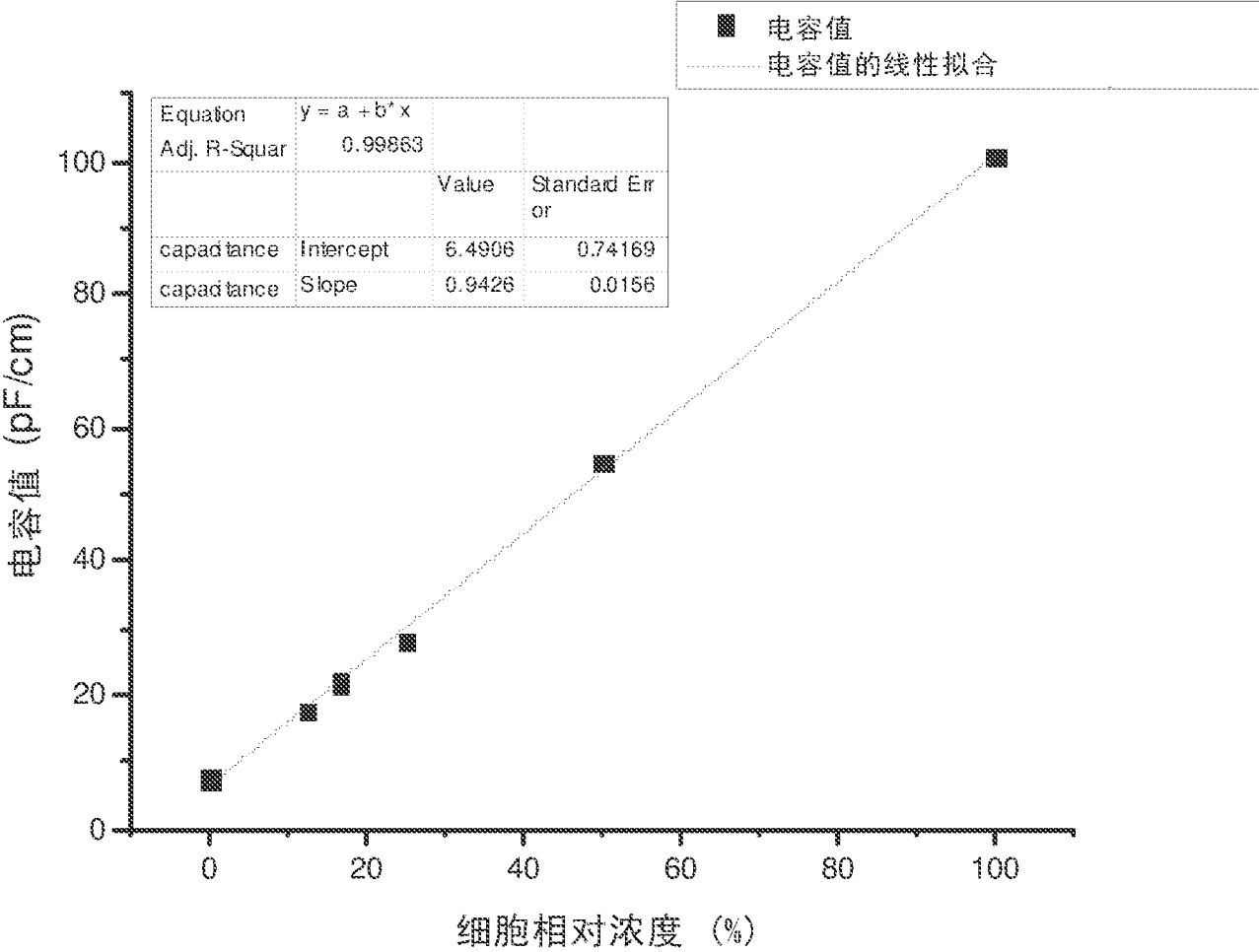


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/112299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 1/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, VEN, Registry, Caplus, web of knowledge: 细胞, 植物, 冷冻保存, 蔗糖, 二甲基亚砜, DMSO, 电容, Cell, plant, cryopreservation, sucrose, sugar, dimethyl sulfoxide, capacitance, capacity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	陈琦. 马铃薯茎尖玻璃化法超低温保存技术研究. 黑龙江农业科学. 31 August 2014 (31.08.2014), no. 8, p. 13. (CHEN, Qi. Study on Cryopreservation Technology of Potato Stem Tip by Vitrification. Heilongjiang Agricultural Sciences.)	1, 3-8
Y	尹增芳等. 鹅掌楸花粉保存条件的比较研究. 江苏林业科技. 30 June 1997 (30.06.1997), no. 02. (YIN, Zengfang et al. The study on the Storage Conditions of Liriodendron Chinense Sarg.pollen. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology.)	1, 3-8
Y	刘华英等. 罗汉果试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生. 中草药. 12 February 2009 (12.02.2009), no. 02. (LIU, Huaying et al. Cryopreservation of Test-Tube Shoot Tips of Siraitia grosvenorii by Vitrification and Plant Regeneration. Chinese Traditional and Herbal Drugs.)	3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 31 January 2018	Date of mailing of the international search report 07 February 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Ruizeng Telephone No. (86-10) 62084379

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/112299

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103283716 A (HE, Bin) 11 September 2013 (11.09.2013), entire document	1-10
A	CN 104585165 A (CHEN, Deqiong) 06 May 2015 (06.05.2015), entire document	1-10
A	CN 103478118 A (INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE AND VETERINARY MEDICINE SHANDONG ACADEMY OF AGRICALRURAL SCIENCES) 01 January 2014 (01.01.2014), entire document	1-10
A	CN 105432597 A (MA, Yanlin) 30 March 2016 (30.03.2016), entire document	1-10
A	CN 101971799 A (JIANGSU BEIKE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 16 February 2011 (16.02.2011), entire document	1-10
A	CN 102480935 A (CG BIOTECH GROUP CO., LTD.) 30 May 2012 (30.05.2012), entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/112299

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103283716 A	11 September 2013	CN 103283716 B	26 November 2014
CN 104585165 A	06 May 2015	None	
CN 103478118 A	01 January 2014	CN 103478118 B	26 November 2014
CN 105432597 A	30 March 2016	None	
CN 101971799 A	16 February 2011	CN 102428910 A	02 May 2012
CN 102480935 A	30 May 2012	WO 2011010796 A2	27 January 2011
		KR 20110009497 A	28 January 2011
		CN 102480935 B	17 June 2015
		US 2012122071 A1	17 May 2012
		WO 2011010796 A3	24 March 2011
		KR 101092411 B1	09 December 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/112299

A. 主题的分类

A01N 1/02 (2006.01) i

按照国际专利分类 (IPC) 或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献 (标明分类系统和分类号)

A01N1/02

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库 (数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))

CNABS、CNKI、DWPI、SIPOABS、VEN、Registry、Caplus、web of knowledge: 细胞、植物、冷冻保存、蔗糖、二甲基亚砜、DMSO、电容 Cell, plant, cryopreservation, sucrose, sugar, dimethyl sulfoxide, capacitance, capacity

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	陈琦. “马铃薯茎尖玻璃化法超低温保存技术研究” 黑龙江农业科学, 第8期, 2014年 8月 31日 (2014 - 08 - 31), 第13页	1, 3-8
Y	尹增芳等. “鹅掌楸花粉保存条件的比较研究” 江苏林业科技, 第02期, 1997年 6月 30日 (1997 - 06 - 30),	1, 3-8
Y	刘华英等. “罗汉果试管苗茎尖玻璃化法超低温保存及植株再生” 中草药, 第02期, 2009年 2月 12日 (2009 - 02 - 12),	3
A	CN 103283716 A (贺彬) 2013年 9月 11日 (2013 - 09 - 11) 全文	1-10
A	CN 104585165 A (陈德琼) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 全文	1-10
A	CN 103478118 A (山东省农业科学院畜牧兽医研究所) 2014年 1月 1日 (2014 - 01 - 01) 全文	1-10
A	CN 105432597 A (马燕琳) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2018年 1月 31日

国际检索报告邮寄日期

2018年 2月 7日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

田瑞增

传真号 (86-10) 62019451

电话号码 (86-10) 010-62084379

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101971799 A (江苏省北科生物科技有限公司) 2011年 2月 16日 (2011 - 02 - 16) 全文	1-10
A	CN 102480935 A (CG生物技术有限公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30) 全文	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/112299

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103283716	A	2013年 9月 11日	CN	103283716	B	2014年 11月 26日
CN	104585165	A	2015年 5月 6日	无			
CN	103478118	A	2014年 1月 1日	CN	103478118	B	2014年 11月 26日
CN	105432597	A	2016年 3月 30日	无			
CN	101971799	A	2011年 2月 16日	CN	102428910	A	2012年 5月 2日
CN	102480935	A	2012年 5月 30日	WO	2011010796	A2	2011年 1月 27日
				KR	20110009497	A	2011年 1月 28日
				CN	102480935	B	2015年 6月 17日
				US	2012122071	A1	2012年 5月 17日
				WO	2011010796	A3	2011年 3月 24日
				KR	101092411	B1	2011年 12月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)