(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 019010 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента: 2013.12.30

(51) Int. Cl. *C12N 5/04* (2006.01) *A01H 4/00* (2006.01)

(21) Номер заявки: 201200749

(22) Дата подачи: 2012.04.25

(54) ШТАММ КУЛЬТУРЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ШЛЕМНИКА АНДРАХНОВИДНОГО (SCUTELLARIA ANDRACHNOIDES VVED.) - SCUT. ANDR. (TC) - ПРОДУЦЕНТ ВОГОНОЗИДА И АКТЕОЗИДА

(43) 2013.10.30

(96) 2012000116 (RU) 2012.04.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (RU); ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК КИРГИЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (KG)

(72) Изобретатель:

Кузовкина Инна Николаевна, Прокофьева Мария Юрьевна (RU), Умралина Анара Рустамовна, Чернышева Татьяна Петровна (KG)

(56) КУЗОВКИНА И.Н. и др Образование флавоноидов в pRi Т-ДНК-трансформированных корнях шлемника байкальского (Scutellaria baicalensis Georgi) и способы его регуляции. Физиология растений, 2001, том 48, № 4, с. 523-528

МАЛИКОВ В.М. и др Фенольные соединения растении рода Scutellaria L. Распространение, строение и свойства. Химия природных соединений, 2002, № 4, с. 299-324

ОЛЕННИКОВ Д.Н. и др. Фенольные соединения шлемника байкальскою (Scutellaria baicalensis georgi). Химия растительного сырья, 2009, № 4, с. 89-98

KOVACS GY. et al.: HPLC Determination of Flavonoids in Hairy-Root Cultures of Scutellaria baicalensis Georgi. Chromatographia Supplement, 2004, vol 60, pp. S81-S85

КУЗОВКИНА И.Н. Культивирование генетически трансформированных корней растений: возможности перспективы использования в физиологии растений. Физиология растении, 1992, том 39, вып. 6, с. 1208-1214

(57) Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности. Задачей изобретения является получение штамма недифференцированно растущей каллусной ткани шлемника андрахновидного (Scutellaria andrachnoides Vved.), способного к интенсивному и стабильному росту в условиях in vitro на безгормональных питательных средах и продуцирующего флавон вогонозид и фенилэтаноид актеозид, обладающие высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике. Полученный штамм каллусной ткани шлемника андрахновидного (Scutellaria andrachnoides Vved.) обладает признаками pRi т-ДНК трансформации, а именно: интенсивным ростом на питательных средах простого состава, не содержащих фитогормоны, генетической и биохимической стабильностью. Химический анализ вторичных метаболитов штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного подтверждает, что штамм сохраняет способность к синтезу фенольных соединений (вогонозида и актеозида), характерных для корней проростков и корней целого растения. Установленные факты свидетельствуют об обоснованности причисления штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного к разряду продуцентов вогонозида и актеозида, ценных природных веществ, представляющих большой интерес для медицинской практики.

019010 B1

019010 B1

Область применения

Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности, так как фенольные соединения шлемников, к которым относится такие вещества как флавоны (вогонозид) и фенилэтаноиды (актеозид), обладают высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике.

Уровень техники

Шлемник андрахновидный (Scutellaria andrachnoides Vved.) - многолетнее эндемичное травянистое растение, относящееся к семейству губоцветных (Lamiaceae) и к роду Scutellaria (Флора СССР, Москва, Ленинград, 1954, том 20, стр. 514).

Растение имеет ограниченный, почти "точечный" ареал распространения и встречается в Кыргызстане в районе Атойнокского и Ферганского хребтов на высоте 900-1600 м над уровнем моря.

Это невысокое многолетнее растение высотой 4-12 см, которое растет в каменисто-скалистых местах, цветёт в мае-июне, плодоносит в июле (Абдуллаева М.Н. Род Scutellaria L., Шлемник. Определитель растений Средней Азии, Ташкент, 1987, том 9, стр. 13-37; Умралина А.Р., Лазьков Г.А. Эндемики и редкие виды растений Кыргызстана (Атлас), Бишкек, 2008, стр. 96-97).

Растение включено в Красную Книгу Кыргызской республики. Сведения о его культивировании отсутствуют, и семена растения как эндемика сохраняются в семенном банке Института Биотехнологии Национальной Академии Кыргызской Республики. Шлемник андрахновидный относится к числу декоративных растений. Сведений о составе вторичных веществ в надземной части и в корневой системе растения нет даже в последней обширной сводке узбекских фитохимиков, опубликовавших данные химического состава 57 видов шлемников (Маликов В.М., Юлдашев М.П. Фенольные соединения растений рода Scutellaria. Распространение, строение и свойства. Химия природных соединений 2002 г., т. 4: 299-324 и т. 5: 385-409).

Редкая встречаемость растения и отсутствие данных о содержащихся в его органах низкомолекулярных соединениях послужили причиной для введения в культуру in vitro штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного с целью изучения состава вторичных метаболитов в недифференцированно растущих клетках растения, а также попытки его микроклонального размножения в случае сохранения каллусной тканью способности к проявлению органогенеза.

Известен пример получения и культивирования каллусной ткани другого вида шлемника - шлемника байкальского, имевший место в бывшем СССР в 1982 году (Трофимова Н.А. Шлемник байкальский в изолированной культуре тканей. Вестник Томского государственного университета, 1982 г., стр.80-81). Автору удалось получить каллусную культуру от стерильных проростков шлемника байкальского, которую выращивали на агаризованной питательной среде, содержащей ростовые гормоны - кинетин и 2,4-дихлорфеноксуксусную кислоту (2.4-Д). Присутствие в питательной среде ростовых гормонов, обеспечивающих рост культивируемых клеток, исключает перспективу возможности практического использования экстрактов полученной каллусной культуры ввиду канцерогенного действия экзогенных ростовых веществ. В полученной автором культуре каллусной ткани шлемника байкальского были с помощью тонкослойной хроматографии обнаружены вторичные флавоны, но не был определен их качественный состав и количественное содержание отдельных компонентов.

Апробация малоизвестного вида шлемника - андрахновидного, как объекта для введения в культуру in vitro штамма каллусной ткани представляет большой теоретический и практический интерес с точки зрения оценки возможности индуцированного гормононезависимого роста недифференцированных клеток шлемника андрахновидного и их способности к сохранению способности к синтезу вторичных метаболитов, типичных для корней ювенильного растения.

Почти все виды шлемников относятся к числу исчезающих растений (шлемник байкальский) или эндемиков (шлемник андрахновидный), что диктует необходимость введения в культуру in vitro их клеток и тканей особенно корневого происхождения, так как именно в корнях синтезируются флавоны. Именно поэтому нами был использован для введения в культуру in vitro эндемичный вид шлемника андрахновидного - Scutellaria andrachnoides.

Задача изобретения

Задачей изобретения является получение штамма недифференцированно растущей каллусной ткани шлемника андрахновидного Scutellaria andrachnoides, способного к интенсивному и стабильному росту в условиях in vitro на безгормональных питательных средах и сохраняющего при этом способность к синтезу основных фенольных соединений, характерных для клеток корней целого растения.

Решение задачи

Поставленная задача решается созданием нового штамма культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного Scut. andr. (TC) (Scutellaria andrachnoides Vved) - продуцента флавона вогонозида и фенилэтаноида актеозида.

Штамм культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного Scut.and.(TC) (Scutellaria andrachnoides Vved.) депонирован в Коллекции генетически трансформированных корней растений при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений Российской

академии наук под обозначением - Scut. andr. (TC) - продуцент вогонозида и актеозида.

Справка о депонировании штамма культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного Scut. andr. (TC) представлена в материалах заявки.

Новизна изобретения - впервые получен штамм культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного (Scutellaria andrachnoides Vved.) Scut. andr. (TC) - продуцент флавона - вогонозида и фенилэтаноида актеозида.

Сущность изобретения

В результате проведенной генетической трансформации проростков шлемника андрахновидного с помощью дикого штамма ATCC 15834 почвенной агробактерии получена новая растительная система - штамм культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) шлемника андрахновидного, способного к стабильному круглогодичному росту в питательных средах, не содержащего экзогенные ростовые вещества и способного к синтезу значительного количества вогонозида и актеозида, сопоставимого с содержанием этих веществ в медленно растущих и трудно возобновляемых корнях целого растения шлемника андрахновидного.

Реализация изобретения

При получении штамма культуры каллусной ткани Scut.andr.(TC) Scutellaria andrachnoides Vved.путём pRi T-ДНК трансформации используют стерильные проростки этого растения, выращенные из стерильных семян, с первыми двумя настоящими листочками. Стерилизацию обезжиренных этиловым спиртом семян проводят концентрированной серной кислотой в течение 3 мин, после чего их тщательно отмывают стерильной дистиллированной водой. Простерилизованные семена помещают в чашки Петри на агаризованную питательную среду Стрита и выдерживают их в течение 4-5 дней при 26°C в темноте (Смирнов А.М. Рост и метаболизм изолированных корней в стерильной культуре. М.: Наука, 1970, с. 92). Не контаминированные проросшие семена переносят в биологические пробирки на питательную среду того же состава. Выращивание ювенильных растений проводят при температуре 26°C на свету (12-часовое освещение люминесцентными лампами). После появления пары настоящих листьев надземную часть проростков отделяют, разрезают на сегменты, которые после осторожного накалывания иглой инсулинового шприца помещают в жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), содержащую суспензию 48-часовой почвенной бактерии. Для инокуляции эксплантов проростков используют дикий (немодифицированный) штамм Agrobacterium rhizogenes (ATCC 15834). После инкубации с бактериями обработанные экспланты промывают стерильной средой и переносят на агаризованную питательную среду МС, не содержащую гормонов, но с добавлением антибиотика (клафоран - 500 мг/мл среды) для элиминирования бактерии. Через 3-4 недели на семядолях и первых листочках в зонах поранения появляются плагиотропно растущие корни, что является морфологическим признаком успешно прошедшей генетической трансформации (фиг. 1). Эти трансформированные участки отделяют и пересаживают на агаризованную питательную среду Гамборга (B5), содержащую уменьшенную дозу антибиотика (250 мг/мл среды). После 2-3 пассажей (период между пассажами составляет 5-7 недель) и достижения полного элиминирования агробактерий образовавшиеся корни переносят в чашки Петри с агаризованной средой того же состава, но без антибиотика, и выращивают в темноте при температуре 25°C. Исключение антибиотика после элиминирования бактерии приводит к стимуляции роста корней (фиг. 2). Полученные генетически трансформированные корни сразу переводят в жидкую питательную среду, т.е. в условия погруженной качалочной (90 об/мин) культуры (фиг. 3). Выращивание трансформированных корней в течение двух циклов (пассажей) в условиях погруженной культуры на среде без антибиотика приводит к проявлению у полученных корней признаков недифференцированного роста (каллусогенеза) и к получению так называемой "смешанной" культуры (фиг. 4). К концу 3-го пассажа культивирования в погруженных условиях отмечаемая тенденция к проявлению недифференцированного роста усиливается, и от смешанной культуры отделяются участки каллусной ткани (фиг. 5), которые дают начало штамму культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC), растущей в жидкой питательной среде, не содержащей экзогенные ростовые вещества. Этот штамм культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного способен к длительному и очень быстрому росту в жидкой питательной среде Гамборга B-5 (без гормонов) в виде массы недифференцированных клеток, лишенных признаков ризогенеза (фиг. 6).

Длительность одного цикла (пассажа) выращивания штамма культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) составляет 4 недели. Пересадку каллусной ткани осуществляют путем переноса инокулятов (каждый - около 2 г сырого веса) в колбы объемом 300 мл, содержащие по 100 мл жидкой питательной среды. Культивирование штамма культуры каллусной ткани проводится в условиях постоянного качания (90 об/мин) при температуре 25°C в темноте. При освещении клетки штамма каллусной ткани интенсивно зеленеют (фиг. 7). Интенсивный рост клеток штамма Scut. andr. (TC) требует добавления порции свежей питательной среды (50 мл) в конце 3-ей недели цикла культивирования. В случае истощения питательной среды каллусная ткань начинает темнеть, окрашивая при этом и остатки жидкого субстрата, что приводит к постепенной гибели клеток.

Результаты изобретения

К настоящему времени штамм культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) (Scutellaria andrachnoides Vved.) растёт стабильно, образуя в течение пассажа мощную массу недифференцированных крупных

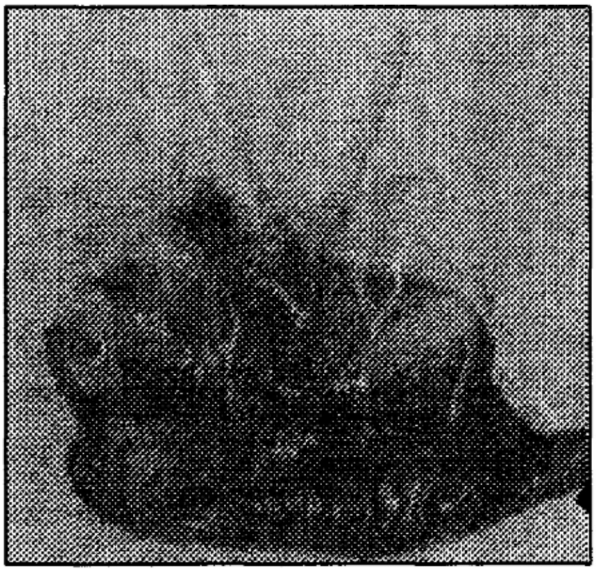
клеточных агрегатов (фиг. 6). Каллусная культура шлемника при выращивании в темноте светлая, при недостатке питательной среды постепенно темнеющая.

Штамм Scut. andr. (TC) шлемника андрахновидного обладает признаками pRi т-ДНК трансформации, а именно: интенсивным и стабильным ростом на питательных средах, не содержащих фитогормоны, способностью к синтезу опинов, которые являются маркерным признаком прошедшей трансформации, а также генетической и биохимической стабильностью. Попытки получить суспензию клеток этого штамма оказываются неудачными, так как клетки штамма Scut, andr. (TC) при выращивании в жидкой среде быстро образуют крупные агрегаты.

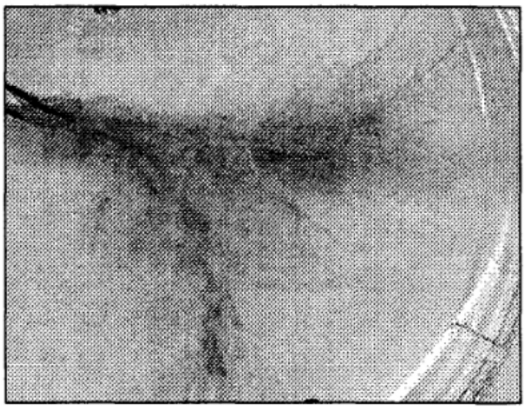
Химический анализ вторичных метаболитов штамма культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) (Scutellaria andrachnoides Vved.) подтверждает, что они сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов, характерных для корней целого растения. Основными вторичными метаболитами штамма культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного являются фенольные соединения - флавон вогонозид, а также фенилэтаноид актеозид. Профиль высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) метанольного экстракта штамма культуры каллусной ткани Scutellaria andrachnoides Vved. Scut. andr. (TC) имеет большое сходство с профилем соответствующего экстракта штамма культуры корня шлемника по времени удерживания (R_t) детектируемых веществ (фиг. 8 и 9). В результате препаративного разделения метанольного экстракта штамма культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) (Scutellaria andrachnoides Vved.) были выделены и очищены 2 доминирующих вещества, которые на основании данных ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР-спектрометрии идентифицированы как флавон вогонозид и фенилэтаноид актеозид. Структурные формулы выделенных и идентифицированных вторичных метаболитов представлены на фиг. 10. Определено количественное содержание вогонозида и актеозида в штамме культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) шлемника андрахновидного. Концентрация идентифицированных вторичных метаболитов в куллусной культуре несколько ниже, чем в штамме культуры корня, но быстрый и интенсивный рост штамма культуры каллусной ткани Scut. andr. (TC) компенсирует этот недостаток и сохраняет общую продуктивность штамма на высоком уровне, обеспечивая при этом большое удобство для выделения метаболитов. Установленные факты свидетельствует об обоснованности причисления штамма штамма культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного Scut. andr. (TC) к разряду продуцентов вогонозида и актеозида, ценных природных веществ, представляющих большой интерес для медицинской практики.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

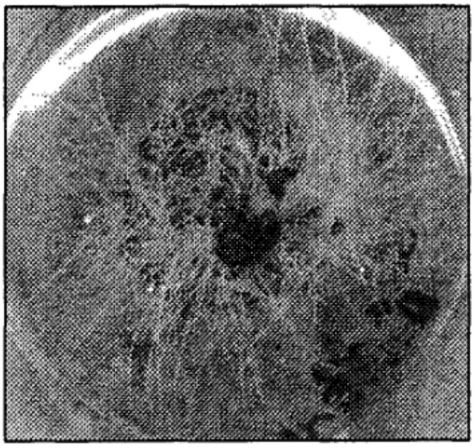
Штамм культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного (Scutellaria andrachnoides Vved.), депонированный в Коллекции генетически трансформированных корней растений (КГТКР) при ФГБУН ИФР РАН под обозначением Scut. andr. (TC) - продуцент вогонозида и актеозида.



Фиг. 1. Первичный ризогенез на листовой пластинке проростка шлемника



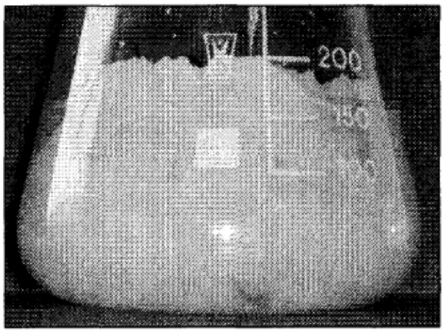
Фиг. 2. Первый пассаж культуры корня на агаризованной среде без антибиотика



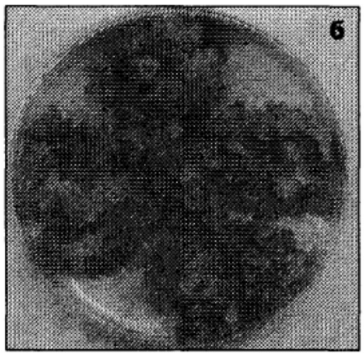
Фиг. 3. Первый пассаж культуры корня в жидкой питательной среде

Фиг. 4, 5. Проявление каллусогенеза у культуры корня во время третьего пассажа в жидкой среде

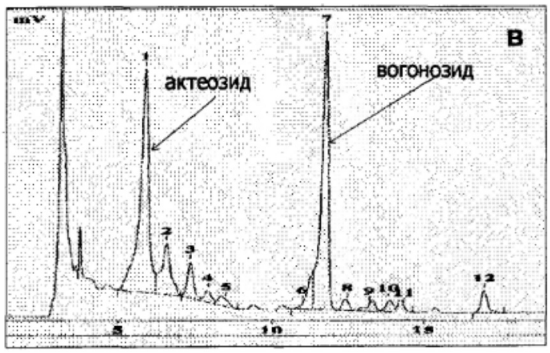
Фиг. 1-5. Последовательность образования каллусной ткани при получении генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного (Scutellaria andrachnoidesVved.)



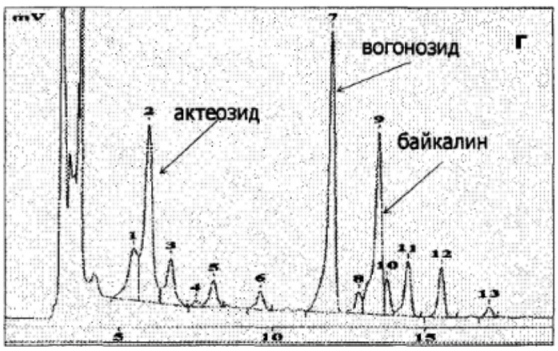
Фиг. 6. Четырехнедельный штамм каллусной ткани, растущий в течение 4 лет в жидкой питательной среде



Фиг. 7. Трехнедельный штамм каллусной ткани шлемника при выращивании на свету

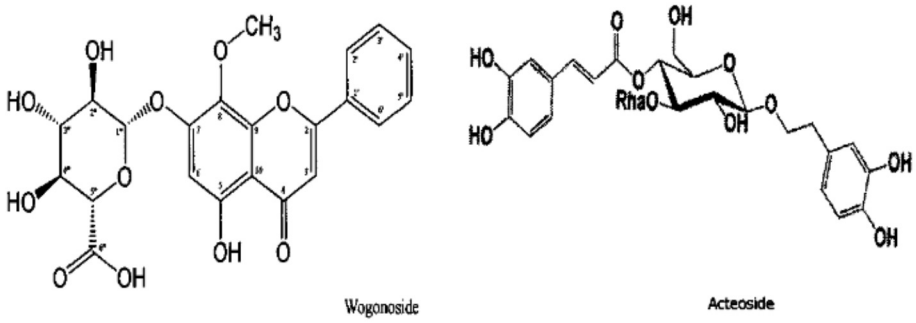


Фиг. 8. ВЭЖХ профиль метанольного экстракта штамма культуры каллусной ткани



Фиг. 9. ВЭЖХ профиль метанольного экстракта штамма культуры корня шлемника

Фиг. 6-9. Стабильно растущий штамм культуры каллусной ткани шлемника при выращивании в разных условиях и ВЭЖХ профили экстрактов штамма культуры каллусной ткани и штамма культуры корня.



Фиг. 10. Структурные формулы двух основных фенольных метаболитов, идентифицированных в штамме культуры каллусной ткани Scut. andr. (CT) - флавон вогонозид и фенилэтаноид актеозид.