



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2004101973/13**, **22.01.2004**

(24) Дата начала действия патента: **22.01.2004**

(45) Опубликовано: **27.05.2005** Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ВОЛОДИН В.В. Экдистероиды в интактных растениях и клеточных культурах. Автореферат диссертации на соискание уч. ст. д.б.н. - М., 1999. Биология растений: культура клеток. - М.: ВО "Агропромиздат", 1989, с.10-15. RU 1806188 А3, 30.03.1993.**

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24, Коми научный центр УрО РАН, патентно-лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

Алексеева Л.И. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (RU)

(54) **ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ AJUGA REPTANS L**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к технологии выращивания растительных тканей, и может быть использована для получения биологически активных веществ, в частности экдистероидов. Питательная среда, позволяющая выращивать клеточную культуру *Ajuga reptans* L. на агаризованной модифицированной питательной среде, содержит макро- и микросоли по Мурасиге-Скугу, сахарозу –

30 г/л, инозитол – 100 мг/л. Витамины по Стаба содержит, мг/л: фолиевая кислота – 0,5; рибофлавин – 0,5; биотин – 1, Са-пантотенат – 1, пиридоксин – 1, тиамин хлорид – 1, никотинамид – 2, кобаламин – 0,0015 и поливинилпирролидон – 2 г/л, с добавлением β -ситостерина от 5 мг/л до 50 мг/л или $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 606,5 мг/л. Изобретение позволяет увеличить содержание экдистероидов в клеточной культуре *Ajuga reptans* L. 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2004101973/13, 22.01.2004**

(24) Effective date for property rights: **22.01.2004**

(45) Date of publication: **27.05.2005 Bull. 15**

Mail address:

**167982, g. Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja,
24, Komi nauchnyj tsentr UrO RAN, patentno-
litsenzionnyj otdel**

(72) Inventor(s):

Alekseeva L.I. (RU)

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (RU)**

(54) **NUTRIENT MEDIUM FOR CELL CULTURE AJUGA REPTANS L. CULTIVATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, plant tissue cultivation for production of bioactive substances, in particular ecdisteroids.

SUBSTANCE: broth for culture *Ajuga reptans* L. cultivation on gelatinized modified nutrient medium contains Murashige-Skoog macro- and microsalts, saccharose 30 g/l; inositol 100 mg/l; Stab vitamins (mg/l): folic acid 0.5; riboflavin

0.5; biotin 1; Ca-pantothenate 1; pyridoxine 1; thiamin chloride 1; nicotine amide 2; cobalamine 0.0015; and polyvinyl pyrrolidone 2 g/l with addition of beta-sitosterol 5-50 mg/l or MnSO₄·x5H₂O 606.5 mg/l.

EFFECT: cell culture *Ajuga reptans* L. with increased content of ecdisteroids.

2 tbl, 5 ex

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к технологии выращивания растительных тканей, и может быть использовано для получения биологически активных веществ, в частности экидистероидов.

Питательная среда для выращивания клеточной культуры *Ajuga reptans* L. из патентных источников не выявлена. Наиболее близкой к заявленному изобретению является агаризованная питательная среда для выращивания клеточной культуры *Ajuga reptans* L. (Володин В.В. Экидистероиды в интактных растениях и клеточных культурах // Автореферат дис. доктора биол. наук. 1999. Москва. 52 с.) следующего состава: макро- и микросоли по Мурасиге-Скугу, сахароза - 30 г/л, инозитол - 100 мг/л и витамины по Стаба, мг/л: фолиевая кислота - 0,5; рибофлавин - 0,5; биотин - 1; Са-пантотенат - 1; пиридоксин - 1; тиамин хлорид - 1; никотинамид - 2; кобаламин - 0,0015 и поливинилпирролидон - 2 г/л. Данный состав питательной среды не позволяет получить клеточные культуры с высоким содержанием экидистероидов.

Технический результат настоящего изобретения состоит в определении состава питательной среды для получения клеточной культуры *Ajuga reptans* L. с высоким содержанием экидистероидов.

Технический результат достигается тем, что клеточную культуру *Ajuga reptans* L. выращивают на агаризованной питательной среде, которая в отличие от прототипа содержит дополнительно β -ситостерин 5-50 мг/л или дополнительно $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 606,5 мг/л.

Пример 1. Контроль (по прототипу).

Для получения клеточной культуры *Ajuga reptans* L. готовили питательную среду, используя химически чистые реактивы. Готовили агаризованную питательную среду следующего состава: макро- и микросоли по Мурасиге-Скугу, сахароза - 30 г/л, инозитол - 100 мг/л и витамины по Стаба, мг/л: фолиевая кислота - 0,5; рибофлавин - 0,5; биотин - 1; Са-пантотенат - 1; пиридоксин - 1; тиамин хлорид - 1; никотинамид - 2; кобаламин - 0,0015 и поливинилпирролидон - 2 г/л. Среду стерилизовали в автоклаве 10 мин при 1 атм. Чашки Петри стерилизовали в сухожаровом шкафу при 180° С, завернутые в бумагу Крафт. В стерильном боксе в чашки Петри разливали по 40 мл питательной среды. Первичную клеточную культуру *Ajuga reptans* L. пассировали на агаризованную среду. Чашки Петри термостатировали при 26±1°С в условиях темноты. Спустя 4 недели определяли интенсивность роста и содержание экидистероидов в клеточной культуре. Интенсивность роста определяли по изменению сырой массы клеток в цикле выращивания. Повторность вариантов для клеточных культур 5-ти кратная.

Экидистероиды определяли в биомассе клеточных культур, которую высушивали при 60 ° С в течение 24 часов. 50-80 мг высушенной измельченной пробы экстрагировали метанолом в течение 16-18 ч. После центрифугирования аликвоту 1 мл разбавляли дистиллированной водой (1:4) и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С 16 (БиоХимМак, Россия). Сорбированные экидистероиды элюировали 3 мл 60%-ного метанола и анализировали ВЭЖХ. Анализ экидистероидов из клеточных культур проводили на хроматографической системе Varian, Pro Star (США), колонка Diasorb C16/T (150× 4мм) (БиоХимМак, Россия), размер частиц 7 мкм; состав элюента: ацетонитрил-вода (100:20, по объему); скорость элюции - 1.5 мл/мин. Детектирование проводили при $\lambda = 242$ нм. В качестве стандартов веществ использовали эталонные образцы экидистероидов, полученные в лаборатории биохимии и биотехнологии растений (Институт биологии Коми НЦ УрО РАН). Количество экидистероидов рассчитывали методом абсолютной калибровки.

Содержание в клеточной культуре *Ajuga reptans* L. 20-гидроксиэкидизона составило 0,293 ± 0,010 мг/г сухой массы, 29-норциастерона + 29-норсенгостерона - 0,031 ± 0,001 мг/г, аюгалактона - 0,096 ± 0,010 мг/г, суммы экидистероидов - 0,420 мг/г.

Пример 2-4.

Получение клеточной культуры проводят аналогично примеру 1, различием является добавление в среду β -ситостерина в количестве 5 мг/л; 25 мг/л; 50 мг/л. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1						
Варианты	Концентрация β -ситостерина в среде, мг/л	Индекс роста по сырой массе	Содержание экидистероидов, мг/г сухой массы			
			20-гидроксиэкидизон	29-норциастерон + 29-норсенгостерон	Аюгалактон	Сумма экидистероидов
1	Контроль	8,58±0,87	0,293±0,010	0,031±0,001	0,096±0,010	0,420
2	5	7,36±0,52	0,250±0,010	0,031±0,001	0,233±0,047	0,514
3	25	10,18±0,76	1,041±0,031	0,567±0,044	0,527±0,023	2,135
4	50	12,00±0,78	1,228±0,047	0,166±0,007	1,058±0,089	2,452

При концентрации в среде β -ситостерина 5 мг/л увеличение концентрации аюгалактона составляет 242%. При концентрации в среде β -ситостерина 25 мг/л увеличение концентрации 20-гидроксиэкидизона составляет 355%, концентрации 29-норциастерона + 29-норсенгостерона - 1830%, концентрации аюгалактона - 549%, суммы экидистероидов - 508%. При концентрации в среде β -ситостерина 50 мг/л увеличение концентрации 20-гидроксиэкидизона составляет 419%, концентрации 29-норциастерона + 29-норсенгостерона - 535%, концентрации аюгалактона - 1102%, суммы экидистероидов - 584%.

Пример 5.

Получение клеточной культуры проводят аналогично примеру 1, различием является добавление в среду дополнительно $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 606,5 мг/л. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2						
Варианты	Концентрация $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, мг/л	Индекс роста по сырой массе	Содержание экидистероидов, мг/г сухой массы			
			20-гидроксиэкидизон	29-норциастерон + 29-норсенгостерон	Аюгалактон	Сумма экидистероидов
1	Контроль(по прототипу) (24,1)	8,58±0,87	0,293±0,010	0,031±0,001	0,096±0,010	0,420
5	630,6	13,94±1,70	0,905±0,010	0,401±0,010	0,612±0,047	1,918

При концентрации в среде $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 630,6 мг/л увеличение концентрации 20-гидроксиэкидизона составляет 309%, концентрации 29-норциастерона + 29-норсенгостерона - 1294%, концентрации аюгалактона - 638%, суммы экидистероидов - 456%.

Таким образом, применение предлагаемого состава питательной среды позволяет увеличить содержание экидистероидов в клеточной культуре *Ajuga reptans* L.

Формула изобретения

Питательная среда для выращивания клеточной культуры *Ajuga reptans* L., характеризующаяся тем, что она содержит компоненты в следующем количественном соотношении, мг/л:

Агар-агар 8000
 KNO_3 1900
 NH_4NO_3 1650
 CaCl_2 332
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370
 KH_2PO_4 170
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,85
 Na_2 ЭДТА 37,25
 H_3BO_3 6,2
 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 24,1

ZnSO₄·7H₂O 8,6
Na₂MoO₄ 0,25
KI 0,83
CuSO₄·5H₂O 0,025
5 CoCl₂·6H₂O 0,025
сахароза 30000
инозитол 100
фолиевая кислота 0,5
10 рибофлавин 0,5
биотин 1
Са-пантотенат 1
пиридоксин 1
тиамина хлорид 1
никотинамид 2
15 кобаламин 0,0015
поливинилпирролидон 2000
β-ситостерин или 5-50
MnSO₄·5H₂O 606,5
20 вода до 1 л

25

30

35

40

45

50