



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108010

(13) U

(51) МПК

C12N 5/04 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 00418**

(22) Дата подання заявки: **19.01.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **24.06.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **24.06.2016, Бюл.№ 12**

(72) Винахідник(и):

**Стрельник Оксана Олександрівна (UA),
Льошина Людмила Георгіївна (UA),
Булко Ольга Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**Стрельник Оксана Олександрівна,
вул. Борщагівська, 146, кв. 704, м. Київ-056,
03056 (UA),
Льошина Людмила Георгіївна,
вул. Закревського, 53, кв. 37, м. Київ-232,
02232 (UA),
Булко Ольга Володимирівна,
вул. Новаторів, 22-б, кв. 135, м. Київ-90,
02090 (UA)**

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КУЛЬТУРИ "HAIRY ROOTS" НАПЕРСТЯНКИ ПУРПУРОВОЇ DIGITALIS PURPUREA L. - ДЖЕРЕЛА СЕРЦЕВИХ ГЛІКОЗИДІВ

(57) Реферат:

Спосіб отримання культури генетично трансформованих коренів *Digitalis purpurea* L. - продуцента серцевих глікозидів за допомогою трансформації листових експлантів рослини ґрунтовою бактерією *Agrobacterium rhizogenes* (штам 15834), що складається з одержання рослинних експлантів, кокультивування їх в суспензії агробактерій, відмивання експлантів, розміщення їх на селективному середовищі, поступової елімінації бактерій та отримання культури Ri-трансформованих коренів, здатних до синтезу вторинних метаболітів. Рослинні експланти наперстянки пурпурової обробляють агробактеріальною суспензією, що приводить до Ri-трансформації і утворення культури генетично трансформованих коренів, що активно і стабільно росте на безгормональному середовищі і синтезує серцеві глікозиди, притаманні інтактній рослині, в більшій кількості, ніж калусна культура.

UA 108010 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології і стосується способу отримання культури генетично трансформованих коренів з наперстянки пурпурової *Digitalis purpurea* L. методом трансформації рослинних експлантів ґрунтовою бактерією *Agrobacterium rhizogenes*, яка може бути використана у фармацевтичній промисловості як сировина для отримання серцевих глікозидів.

На сьогодні відомо спосіб отримання калусної культури клітин *Digitalis purpurea* в якій синтез кардіоглікозидів є недостатній для промислового вирощування [Hagimori M, Matsumoto T, Kisaki T. Studies on the production of Digitalis cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several Digitalis species by radioimmunoassay //Plant Cell Physiol. - 1980. - V. 21, N. 8. - P. 1391-404]. Також опубліковано дані, що агробактеріальна трансформація Ti-плазмідом *Digitalis lanata* сприяє біосинтезу серцевих глікозидів в культурі клітин [Moldenhauer D., Fürst B., Diettrich B., Luckner M. Cardenolides in Digitalis lanata Cells Transformed with Ti-Plasmids //Planta Med. - 1990 Oct. - V. 56, N. 5. - P. 5-8]. Розроблено методики для різних рослин, в яких показано біосинтез вторинних метаболітів в культурі коренів "hairy roots", що одержані в результаті Ri-трансформації рослинних експлантів ґрунтовою бактерією *A. rhizogenes* [Carrizo C.N., Pitta-Alvarez S.I., Kogan J., Giulietti A.M., Tomaro M.L. Occurrence of cadaverine in hairy roots of Brugmansia Candida //Phytochemistry. - 2001. - V. 57, N. 5. - P. 759-763; Dhakulkar, S., Ganapathi, T.R., Bhargava, S., Bapat, V.A. Induction of hairy roots in Gmelina arborea Roxb. and production of verbascoside in hairy roots //Plant Science. - 2005. - V. 169, N. 5. - P. 812-818].

Найбільш близьким за технічною суттю є спосіб отримання культури генетично трансформованих коренів *Hedysarum theinum* Krasnob, що включає стерилізацію насіння, отримання паростків, відділення стерильних листових і стеблових експлантів, інокуляція *A. rhizogenes*, розміщення інфікованих експлантів на агаризованому середовищі з додаванням антибіотику, елімінацію бактерій та перенос культури коренів в рідке середовище [Патент № 2360964 C12N5/04 A01H 4/00 Культура корня Hed.th. (*Hedysarum theinum* Krasnob.) - продуцент изофлавоноидов /Кузовкина И.Н., Вдовитченко М.Ю., Альтерман И.Е., Гусева А.В. Заявл. 07.02.2008 Опубл. 10.07.2009, Бюл. № 19].

В основу корисної моделі поставлена задача розробити технологію отримання і культивування культури "hairy roots" наперстянки пурпурової *Digitalis purpurea* L., що стабільно нарощується в умовах глибинного культивування на безгормональному середовищі і здатна синтезувати вторинні метаболіти, що притаманні інтактній рослині.

Digitalis purpurea L. - дворічна трав'яниста рослина, що належить за системою класифікації APG II до родини Plantaginaceae, за системою класифікації Корнкіста - до родини Scrophulariaceae.

Надземна частина рослини *Digitalis purpurea* L. містить понад 60 глікозидів. Серед них первинні глікозиди - пурпуреаглікозиди А, В і глюкогіталоксин, які під дією ендогенних ферментів трансформуються у вторинні глікозиди - дигітоксин, ацетилдигітоксин, дигітонін, гітоксин та інші, більшість з яких використовується як лікарські засоби. Карденоліди *Digitalis purpurea* L. застосовуються при всіх ступенях хронічної серцевої недостатності (декомпенсації) різного походження. Під впливом препаратів наперстянки пурпурової посилюються та прискорюються скорочення серцевого м'яза, підвищується діурез, нормалізується кров'яний тиск, зникають набряки, поліпшується загальний стан організму.

Той факт, що серцеві глікозиди наперстянки пурпурової не мають синтетичних аналогів, а отримання рослинної сировини обмежено сезонними, кліматичними та екологічними факторами, є передумовою для розробки біотехнологічних способів отримання рослинної біомаси продуцента вторинних метаболітів, для цього найбільш перспективним може стати отримання культури генетично трансформованих коренів наперстянки пурпурової в результаті агробактеріум-опосередкованої трансформації рослинних експлантів ґрунтовою бактерією *Agrobacterium rhizogenes*.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання культури генетично трансформованих коренів *Digitalis purpurea* L. - продуцента серцевих глікозидів за допомогою трансформації листових експлантів рослини ґрунтовою бактерією *Agrobacteria rhizogenes* (штам 15834), що складається з одержання рослинних експлантів, кокультивування їх в суспензії агробактерій, відмивання експлантів, розміщення їх на селективному середовищі, поступової елімінації бактерій та отримання культури Ri-трансформованих коренів, здатних до синтезу вторинних метаболітів.

До переваг даного способу можна віднести високу стабільність та продуктивність культури генетично трансформованих коренів, можливість управління синтезом цільових продуктів та

отримання біомаси, яка не містить гербіцидів, пестицидів та важких металів і не залежить від сезонних і кліматичних факторів.

Конкретний приклад запропонованого способу.

Для отримання культури коренів *Digitalis purpurea* L. методом pRi T-ДНК трансформації використовували стерильні проростки цієї рослини з першими двома справжніми листками, які були вирощені зі стерильного насіння. Стерилізацію знежиреного етиловим спиртом насіння *Digitalis purpurea* L. проводили 0,8 % AgNO_3 протягом 5 хв., після чого насіння ретельно відмивали стерильною дистильованою водою.

Суть корисної моделі пояснюють креслення.

Простерилізоване насіння поміщали в культуральні ємності на агаризоване живильне середовище Мурасіге-Скуга (MS) [Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures //Physiol. Plant. - 1962. - N. 15. - P. 473-497] і витримували протягом 3-4 діб при 24 °C в темряві до проростання, після чого не контаміновані проростки переносили в світловий бокс. Вирощування ювенільних рослин проводили при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі 24±1 °C. Після появи чотирьох справжніх листків надземну частину проростків відокремлювали, розрізали на сегменти, які після обережного наколювання голкою інсулінового шприца поміщали в рідке живильне середовище Мурасіге-Скуга, що містило суспензію агробактерії, нарощуваної протягом 48 годин. Для проведення трансформації використовували ґрунтову бактерію *Agrobacterium rhizogenes* (штам 15834). Рослини кокультивували у бактеріальній суспензії протягом 30 хвилин. Після кокультивування з бактеріями оброблені експланти промивали стерильним середовищем. Підсушували на фільтрувальному папері і переносили на агаризоване безгормональне живильне середовище Гамборга [Gamborg O. L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley //Can. J. Biochem. - 1968. - 46, № 5. - P. 417-421], до якого додавали 500 мг/л цефотаксиму для елімінації агробактерії. Через 2 тижні на експлантах в зонах поранення з'являлися трансформовані корені, які мали плагіотропне галуження, що є первинною морфологічною ознакою успішної генетичної трансформації (фіг. 1). Ці трансформовані ділянки відокремлювали і переносили з часткою експланту на середовище B5 зі зменшеною концентрацією антибіотика (250 мг/л). Наступний пасаж проводили з перенесенням відростаючих коренів на середовище з 100 мг/л цефотаксиму (період між пасажами становив 3-4 тижні). Після досягнення повної елімінації бактерії отриману культуру коренів переносили в чашки Петрі з агаризованим середовищем того ж складу, але без антибіотика, і вирощували у темряві при температурі 24 °C (фіг. 2).

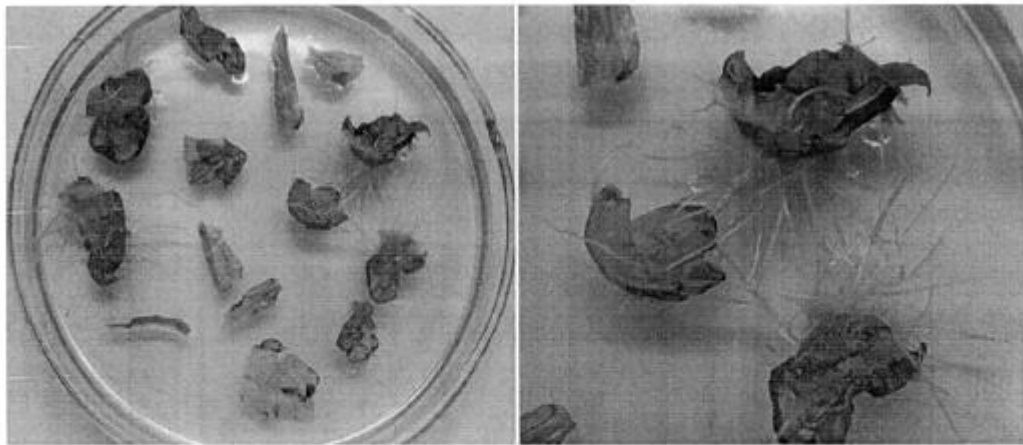
Тривале вирощування культури "hairy roots" наперстянки пурпурової на агаризованому поживному середовищі сприяло закріпленню ознак ризогенезу. Далі для нарощування маси корені були перенесені в колби в умови глибинного культивування в рідке поживне середовище того ж складу без додавання агару. Інкубацію проводили на шейкері при 90 об./хв в темряві при температурі 24±1 °C. Це призводило до активного наростання щільної маси тонких переплетених коренів жовтувато-бежевого кольору (фіг. 3). Для підтримки безперервного росту культури коренів в період 4-6-тижневого інтервалу між пересадками в культуральні колби регулярно додавали свіже поживне середовище.

На сьогоднішній день отримана культура генетично трансформованих коренів стабільно росте і має всі ознаки "hairy roots", а саме інтенсивне зростання на поживному середовищі простого складу, плагіотропне галуження коренів, генетичну і біохімічну стабільність. Аналіз хроматографічного профілю кислотного екстракту культури коренів *Digitalis purpurea* L. (фіг. 4) та калусної культури *Digitalis purpurea* L. (фіг. 5), проведений за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, підтверджує, що отримана культура коренів синтезує весь спектр кардіоглікозидів притаманний інтактній рослині і їх кількість у 2,5 разу перевищує вміст аналогічних сполук в культурі калусних клітин.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

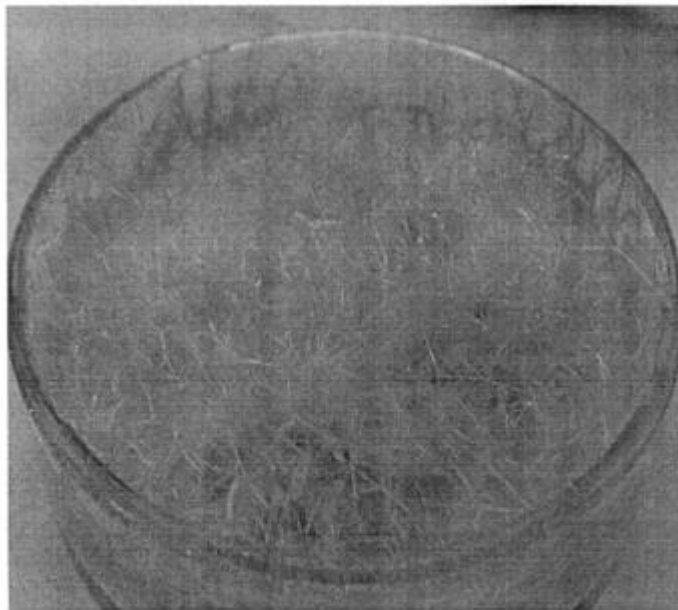
Спосіб отримання культури генетично трансформованих коренів *Digitalis purpurea* L. - продуцента серцевих глікозидів за допомогою трансформації листових експлантів рослини ґрунтовою бактерією *Agrobacterium rhizogenes* (штам 15834), що складається з одержання рослинних експлантів, кокультивування їх в суспензії агробактерій, відмивання експлантів, розміщення їх на селективному середовищі, поступової елімінації бактерій та отримання культури Ri-трансформованих коренів, здатних до синтезу вторинних метаболітів, який **відрізняється** тим, що рослинні експланти наперстянки пурпурової обробляють агробактеріальною суспензією, що приводить до Ri-трансформації і утворення культури

генетично трансформованих коренів, що активно і стабільно росте на безгормональному середовищі і синтезує серцеві глікозиди, притаманні інтактній рослині, в більшій кількості, ніж калусна культура.



Фіг. 1

Первинний ризогенез на листовій пластинці стерильного проростка *Digitalis purpurea* після кокультивування з *A. Rhizogenes*



Фіг. 2

Ri-трансформовані корені *Digitalis purpurea* L. на агаризованому середовищі без цефатоксиму

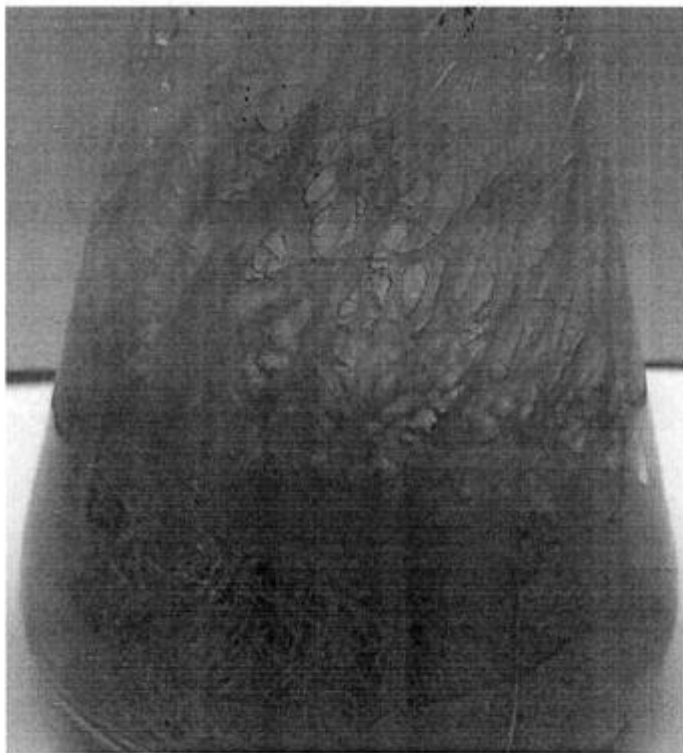
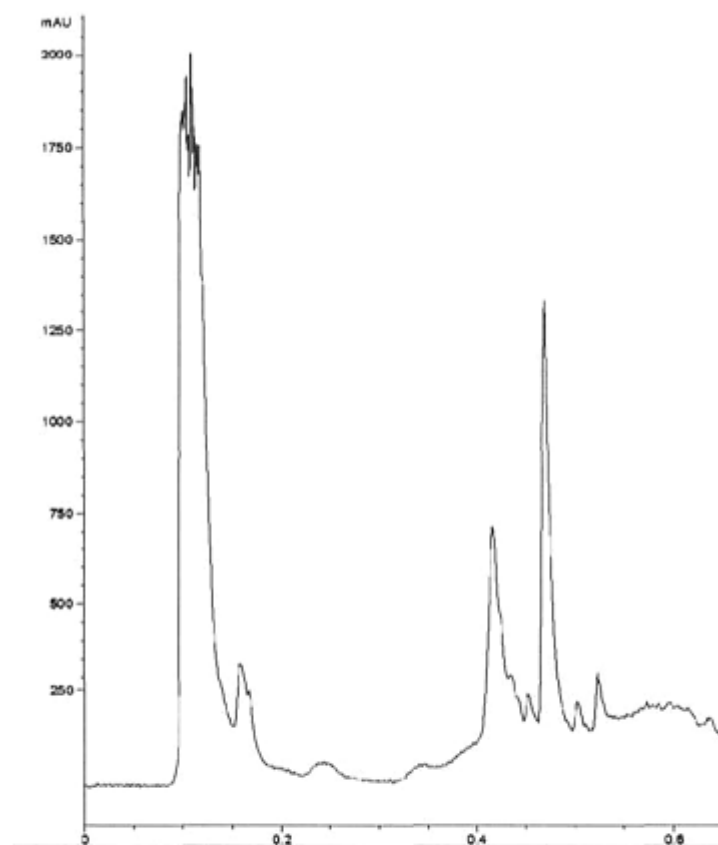


Fig. 3

Культура Ri-трансформованих коренів *Digitalis purpurea* L. в умовах глибинного культивування



Фіг. 4

ВЕРХ профіль кислотного екстракту культури Рі-трансформованих коренів *Digitalis purpurea* L.

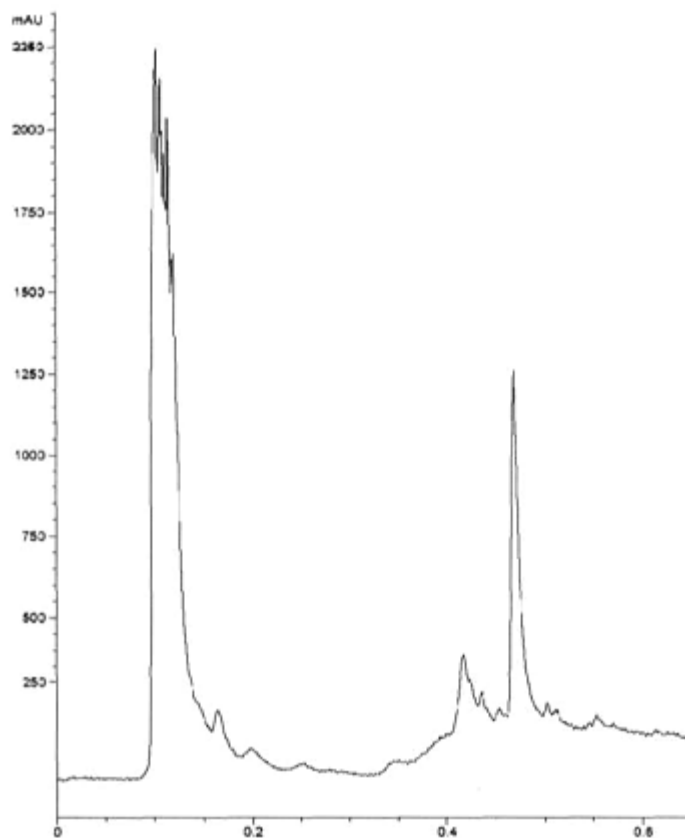


Fig. 5

**ВЕРХ профіль кислотного екстракту
калусної культури *Digitalis purpurea* L.**

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601