



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116171856 B

(45) 授权公告日 2023.08.01

(21) 申请号 202310136482.2

(22) 申请日 2023.02.17

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 116171856 A

(43) 申请公布日 2023.05.30

(73) 专利权人 中国科学院华南植物园

地址 510000 广东省广州市天河区兴科路
723号

(72) 发明人 罗鸣 李玉萍 邱源

(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务

所(普通合伙) 44365

专利代理师 万志香

(51) Int.Cl.

A01H 4/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101939435 A, 2011.01.05

CN 105385649 A, 2016.03.09

CN 109021038 A, 2018.12.18

US 2012227134 A1, 2012.09.06

US 2019218585 A1, 2019.07.18

WO 2022117598 A1, 2022.06.09

审查员 荆丹丹

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种提高甜叶菊中甜菊糖苷含量的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种制备甜菊糖苷含量的方法,包括以下步骤:将甜叶菊种子苗置于含组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基化抑制剂的培养基中培养,收集培养物的地上部,提取甜菊糖苷。本发明还提供了含组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基化抑制剂在提高甜叶菊的甜菊糖苷含量中的应用。本发明使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理甜叶菊种子苗,能有效提高甜叶菊中甜菊糖苷的含量。本发明提供的方法具有简单、快速、高效和成本低等优点,在农业、食品和医药等领域具有广阔的应用空间。

1. 一种制备甜菊糖苷的方法,包括以下步骤:将甜叶菊种子苗在含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂的培养基中培养不少于7天,收集甜叶菊种子苗的地上部,提取甜菊糖苷,获得甜菊糖苷;

所述组蛋白去乙酰化酶抑制剂为烟酰胺,和/或所述DNA甲基转移酶抑制剂为5~氮杂胞苷;

所述烟酰胺在培养体系中的浓度为1.0~2.0 mM;

所述5~氮杂胞苷在培养体系中的浓度为25~50 μM 。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述烟酰胺在培养体系中的浓度1.0mM或2.0 mM。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,5~氮杂胞苷在培养体系中的浓度为25 μM 或50 μM 。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,所述培养时间为7~14天。

5. 根据权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,所述培养基为MS固体培养基,其包含以下浓度的组分:4.43 \pm 0.05 g/L MS培养基、1.0 \pm 0.01 g/L吗啉乙磺酸、20 \pm 0.2 g/L蔗糖、pH=5.8~6.0。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述提取甜菊糖苷的方法包括以下步骤:

(1) 将收集到的培养物的地上部用液氮研磨并冻干,获得样品;

(2) 按照料液比为18~22:1 mg/ml向步骤(1)获得的样品中加入灭菌超纯水,55~65 $^{\circ}\text{C}$ 进行超声提取0.5~1.5小时,吸取上清液,过滤,得到甜菊糖苷。

7. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂在提高甜叶菊的甜菊糖苷含量中的应用,其特征在于,采用权利要求1所述方法。

一种提高甜叶菊中甜菊糖苷含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,具体涉及一种提高甜叶菊中甜菊糖苷含量的方法。

背景技术

[0002] 甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)又名“甜菊”、“甜草”、“甜茶”等,是菊科斯台维亚属的一种小型多年生草本植物,原产于巴拉圭以及巴西等国家,我国于上世纪70年代引种成功,目前已成为世界上最大的甜叶菊生产国和出口国。甜菊糖苷是甜叶菊叶片中的主要活性成分(约占叶片干重的4%~20%),主要包括甜菊苷(stevioside)、瑞鲍迪苷A(rebaudioside A)和瑞鲍迪苷C(rebaudioside C)。甜菊糖苷具有高甜度、低热量等特点,称为天然非营养型甜味剂。此外,还具有抗氧化、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、治疗龋齿、调节免疫等多种药理活性,常用于健康饮料和其他食物的天然甜味添加剂。然而,甜菊糖苷合成的调控机制尚待阐明。

[0003] 表观遗传是指在核酸序列未发生改变的情况下,遗传物质出现了可遗传的变化,从而导致可遗传的表型改变。表观遗传调控是一种普遍存在的基因表达调控方式,主要包括DNA甲基化,组蛋白修饰(甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化等),染色质可及性和非编码RNA调控等。其中,组蛋白乙酰化修饰是表观遗传中的一种重要修饰方式,由组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)催化。HDAC是基因表达的负调控因子,通过将组蛋白和非组蛋白的赖氨酸残基去乙酰化抑制基因的表达。HDAC抑制剂(HDAC inhibitor, HDACi)通过与HDAC结合抑制其催化活性,从而促进基因的转录表达。根据化合物结构的不同,HDACi主要分为苯酰胺类、氧肟酸盐、环肽类、短链脂肪酸类等。其中,烟酰胺(Nicotinamide, NIC)属于苯酰胺类抑制剂, NIC抑制Class III型HDAC。DNA甲基化由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase)和DNA去甲基化酶(DNA demethylase)催化。5~氮胞苷(320~67~2;5~Azacytidine)是一种重要的DNA甲基化抑制剂,能够通过降低DNA的甲基化水平来调节基因的表达,从而调控植物的生长发育等过程。

[0004] 因此,通过探究组蛋白去乙酰化酶抑制剂对甜菊糖苷积累的影响,可以提供有效提高甜叶菊中甜菊糖苷含量的方法,为更好的开发甜叶菊的市场应用奠定一定的基础。

发明内容

[0005] 基于此,本发明的目的在于提供一种提高甜菊糖苷的方法,能有效提高甜叶菊中甜菊糖苷的含量。

[0006] 实现上述技术目的,包括以下技术方案。

[0007] 本发明的第一方面,是一种制备甜菊糖苷的方法,所述方法包括以下步骤:将甜叶菊种子苗在含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂的培养基中培养不少于7天,收集甜叶菊种子苗的地上部,提取甜菊糖苷,获得甜菊糖苷。

[0008] 一种提高甜叶菊中甜菊糖苷的方法,所述方法包括以下步骤:将甜叶菊种子苗在含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂的培养基中培养不少于7天。

[0009] 在其中一些实施例中,所述组蛋白去乙酰化酶抑制剂为NIC,所述DNA甲基转移酶抑制剂为5~氮杂胞苷(5-azacytidine,5-azaC)。

[0010] 在其中一些实施例中,所述NIC在培养体系中的浓度为0.5~2.5mM;

[0011] 在其中一些实施例中,所述5~azaC在培养体系中的浓度为15~60 μ M。

[0012] 在其中一些实施例中,所述NIC在培养体系中的浓度为1.0~2.0mM;5~azaC在培养体系中的浓度为25~50 μ M。

[0013] 在其中一些实施例中,所述NIC在培养体系中的浓度为0.8~1.2mM,进一步优选为1.0mM和2.0mM;所述5~azaC在培养体系中的浓度为22~35 μ M,进一步优选为25 μ M和50 μ M。

[0014] 在其中一些实施例中,所述培养时间为7-14天。

[0015] 在其中一些实施例中,所述培养基为MS固体培养基,其包含以下浓度的组分:4.43 \pm 0.05g/L MS培养基、20 \pm 0.2g/L蔗糖、1.0 \pm 0.01g/L吗啉乙磺酸,pH5.8~6.0。

[0016] (2)按照料液比为18~22:1mg/ml向步骤(1)获得的样品中加入灭菌超纯水,55~65 $^{\circ}$ C进行超声提取0.5~1.5小时,吸取上清液,过滤,得到甜菊糖苷

[0017] 在其中一些实施例中,所述提取甜菊糖苷的方法包括以下步骤:

[0018] (1)将收集到的培养物的地上部用液氮研磨并冻干,获得样品;

[0019] (2)按照料液比为18~22:1mg/ml向步骤(1)获得的样品中加入灭菌超纯水,55~65 $^{\circ}$ C进行超声提取0.5~1.5小时,吸取上清液,过滤,得到甜菊糖苷。

[0020] 优选地,上述步骤(2)为:按照料液比为20:1mg/mL向步骤(1)获得的样品中加入灭菌超纯水,60 $^{\circ}$ C进行超声提取1小时,吸取上清液,过滤,得到甜菊糖苷。

[0021] 在其中一些实施例中,步骤(2)所述超声提取次数为1~2次,吸取上清液过滤后,合并滤液。

[0022] 在其中一些实施例中,所述提取甜菊糖苷的方法还包括以下步骤:

[0023] (3)将步骤(2)蒸干浓度产物用灭菌超纯水重悬,过滤,收集滤液,得到甜菊糖苷。

[0024] 本发明的另一方面,是提供组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂在提高植物的甜菊糖苷含量中的应用。

[0025] 在其中一些实施例中,所述植物为甜叶菊。

[0026] 在其中一些实施例中,所述组蛋白去乙酰化酶抑制剂为NIC。

[0027] 在其中一些实施例中,所述DNA甲基转移酶抑制剂为5~azaC。

[0028] 在其中一些实施例中,所述NIC在培养体系中的浓度为0.5~2.5mM;

[0029] 在其中一些实施例中,所述5~azaC在培养体系中的浓度为15~60 μ M。

[0030] 在其中一些实施例中,所述NIC在培养体系中的浓度为1.0~2.0mM。

[0031] 优选地,所述NIC的终浓度为0.8~1.2mM。

[0032] 在其中一些实施例中,5~azaC在培养体系中的浓度为25~50 μ M。

[0033] 优选地,所述5~azaC的终浓度为22~27 μ M。

[0034] 本发明通过研究首次发现,使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂处理甜叶菊种子苗,能有效提高甜叶菊中甜菊糖苷(包括甜菊苷(stevioside)、瑞鲍迪昔A(rebaudioside A)和瑞鲍迪昔C(rebaudioside C))的含量。本发明提供的方法具有简单、

快速、高效和成本低等优点,在农业、医药等领域具有广阔的应用空间。

附图说明

[0035] 图1为萌芽7天后在含有1.0mM或2.0mM NIC的MS培养基上培养7天的甜叶菊种子苗(上),以及培养7天的甜叶菊种子苗中甜菊糖苷的含量检测结果(下)。

[0036] 图2为萌芽14天后在含有25 μ M和50 μ M 5~azaC的MS培养基上培养7天的甜叶菊种子苗(上),以及培养7天的甜叶菊种子苗中甜菊糖苷的含量检测结果(下)。

具体实施方式

[0037] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0038] 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,例如Green和 Sambrook主编的第四版《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)已于2013年出版,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0039] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0040] 本发明中所用材料如下:

[0041] 固体MS培养基,包括如下组分:4.43g/L MS培养基(Murashige&Skoog 15Basal Medium with Vitamins)、20g/L sucrose(蔗糖)、1.0g/L MES(吗啉乙磺酸),调pH至5.8~6.0。

[0042] NIC母液配制包括以下步骤:称取39.7mg NIC粉末(abcam,ab120864),加入1.3mL 灭菌超纯水溶解,0.22 μ m滤膜过滤除菌,即得。

[0043] 5~azaC母液配制包括以下步骤:称取2.38mg 5~azaC粉末(abcam,ab142744),加入1.3mL灭菌超纯水溶解,0.22 μ m滤膜过滤除菌,即得。

[0044] 含有组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂的固体MS培养基,配制包括以下步骤:将固体MS培养基高压灭菌,冷却凝固前加入NIC母液至终浓度为1.0mM、2.0mM或5~azaC母液至终浓度为25 μ M、50 μ M。

[0045] 以下结合具体实施例对本发明作进一步详细的说明,但不用于限制本发明的保护范围。

[0046] 实施例1

[0047] 1.甜叶菊种子苗的种植

[0048] 取适量甜叶菊种子,用手搓掉种子上的绒毛,置于50mL离心管中,加入30mL蒸馏水,浸泡20~30分钟,弃掉上层漂浮的种子,留下沉入水底的饱满种子进行下一步。吸干水分后,装有饱满种子的50mL离心管中加入20mL 1%NaClO,消毒10~15分钟。然后倒出NaClO,用40mL无菌纯水清洗5次,每次静置10min。清洗完之后加入20mL无菌纯水,4 $^{\circ}$ C放置

24h。

[0049] 2. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂或DNA甲基转移酶抑制剂处理甜叶菊种子苗

[0050] 将步骤1中的种子用滤纸吸干水分,点在MS培养基板上生长,待甜叶菊种子在MS培养基上萌芽7天后,分别转移到含有NIC(终浓度分别为1.0mM、2.0mM)、不含抑制剂(对照组Control)的MS培养基上,分别进行培养,培养后7天收集甜叶菊种子苗的地上部。

[0051] 另一组萌芽14天后,分别转移到5~azaC(终浓度分别为25 μ M和50 μ M)和不含抑制剂(对照组Control)的MS培养基上,分别进行培养,培养后7天收集甜叶菊种子苗的地上部。

[0052] 3. 甜菊糖苷的提取

[0053] (1) 将各组培养获得的甜叶菊种子苗的地上部(包括但不限于甜叶菊种子苗的叶片)使用液氮研磨并冻干,获得样品。

[0054] (2) 超纯水提取:在每20mg样品中加入1mL灭菌超纯水,60 $^{\circ}$ C超声1小时,同时准备新的离心管,做好标记,超声结束后用移液枪吸取上清液至新的离心管;样品中再次加入1mL灭菌超纯水,60 $^{\circ}$ C超声1小时,两次滤液合并后蒸干浓缩。

[0055] (3) 溶解:吸取200 μ L灭菌超纯水重悬提取的化合物,所得的提取液用0.22 μ m滤膜过滤,收集滤液(含甜菊糖苷)。

[0056] 4. 甜菊糖苷的含量测定

[0057] (1) 色谱系统:采用C18柱(250mm \times 4.6mm,5 μ m,Shimadzu,Kyoto,Japan),柱温40 $^{\circ}$ C,流速1mL/min,进样量10 μ L;流动相A:乙腈,流动相B:0.1%甲酸水;梯度洗脱:t=0min,75% B;t=13min,75% B;t=20min,68%B;t=45min,68% B;t=47min,75% B;t=50min,75% B。甜菊糖苷的检测波长为210nm。

[0058] (2) 甜菊糖苷含量计算:通过用不同浓度的甜菊糖苷标品在HPLC上检测峰面积,建立浓度与峰面积之间的标准曲线,标品质量浓度与吸收值强度间具有良好线性。得到Stevioside的标准曲线为:y=2E~06x+0.0114;Rebaudioside A的标准曲线为:y=2E~06x+0.0011;Rebaudioside C的标准曲线为:y=2E~06x~0.0164。

[0059] 本实施例以甜叶菊种子苗为实验材料,使用HDAC抑制剂(NIC)进行处理,处理时间为7天,然后检测培养物地上部甜菊糖苷的含量。根据Stevioside浓度与峰面积之间的标准曲线进行计算,得到Control、1.0mM NIC和2.0mM NIC处理7天的甜叶菊种子苗中Stevioside的浓度分别为:1.26 μ g/mg干重、3.92 μ g/mg干重、1.53 μ g/mg干重;根据Rebaudioside A浓度与峰面积之间的标准曲线进行计算,得到Control、1.0mM NIC和2.0mM NIC处理7天的甜叶菊种子苗中Rebaudioside A的浓度分别为:0.75 μ g/mg干重、2.49 μ g/mg干重、1.16 μ g/mg干重;根据Rebaudioside C浓度与峰面积之间的标准曲线进行计算,得到Control、1.0mM NIC和2.0mM NIC处理7天的甜叶菊种子苗中Rebaudioside C的浓度分别为:0.31 μ g/mg干重、0.71 μ g/mg干重、0.38 μ g/mg干重;

[0060] 如图1所示,与未使用抑制剂处理的对照组相比,1.0mM NIC处理甜叶菊种子苗7天,分别提高Stevioside、Rebaudioside A、Rebaudioside C含量约3.1倍、3.3倍、2.3倍;2.0mM NIC处理甜叶菊种子苗7天,分别提高Stevioside、Rebaudioside A、Rebaudioside C含量约1.2倍、1.5倍、1.2倍。

[0061] 本实施例以甜叶菊种子苗为实验材料,使用DNA甲基化抑制剂(5~azaC)进行处理,处理时间为7天,然后检测培养物地上部甜菊糖苷的含量。根据Stevioside浓度与峰面

积之间的标准曲线进行计算,得到Control、25 μ M 5~azaC和50 μ M 5~azaC处理7天的甜叶菊种子苗中Stevioside的浓度分别为:4.11 μ g/mg干重、9.00 μ g/mg干重、6.97 μ g/mg干重;根据Rebaudioside A浓度与峰面积之间的标准曲线进行计算,得到Control、25 μ M 5~azaC和50 μ M 5~azaC处理7天的甜叶菊种子苗中Rebaudioside A的浓度分别为:1.77 μ g/mg干重、5.84 μ g/mg干重、3.14 μ g/mg干重;根据Rebaudioside C浓度与峰面积之间的标准曲线进行计算,得到Control、25 μ M 5~azaC和50 μ M 5~azaC处理7天的甜叶菊种子苗中Rebaudioside C的浓度分别为:0.67 μ g/mg干重、1.44 μ g/mg干重、0.91 μ g/mg干重。

[0062] 如图2所示,与未使用抑制剂处理的对照组相比,25 μ M 5~azaC处理甜叶菊种子苗7天,分别提高Stevioside、Rebaudioside A、Rebaudioside C含量约2.2倍、3.3倍、2.1倍;50 μ M 5~azaC处理甜叶菊种子苗7天,分别提高Stevioside、Rebaudioside A、Rebaudioside C含量约1.7倍、1.8倍、1.4倍。

[0063] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对以上实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0064] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

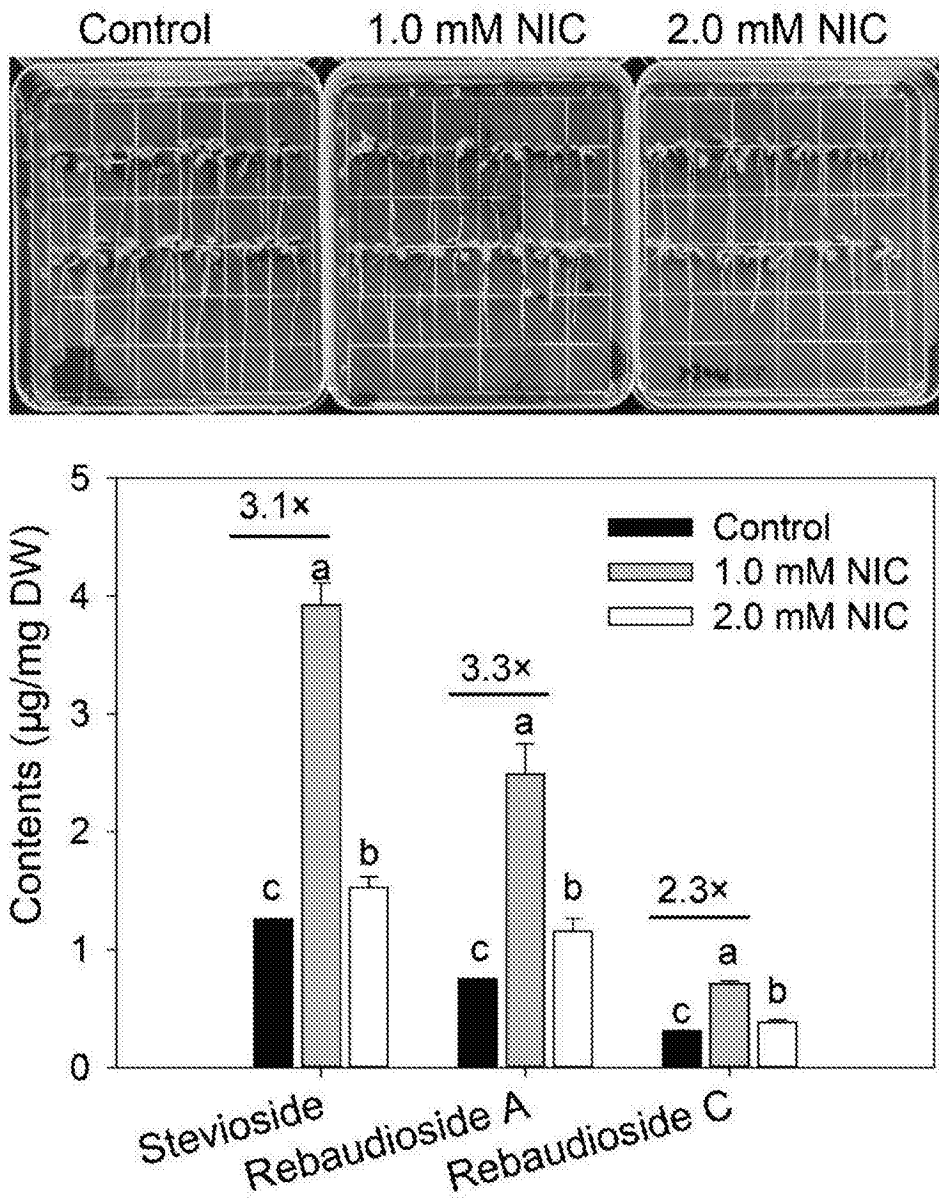


图1

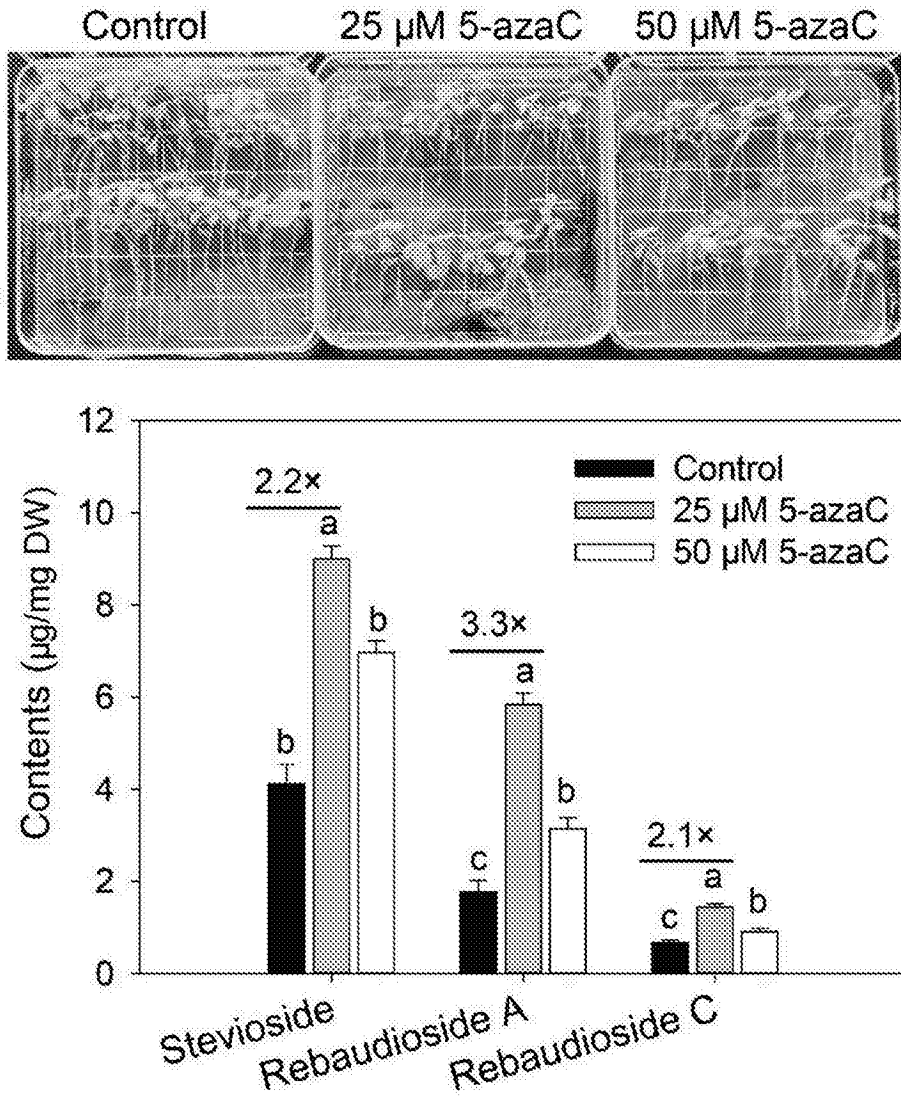


图2