

权 利 要 求 书

1. 一种金龙胆草离体细胞的培养方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、外植体的选择与灭菌：采集幼嫩且叶表面积相对较大的新叶作为备用外植体；在超净工作台中，将外植体于无菌水下冲洗，用无菌滤纸吸干残留水份；将处理后的叶片转入 70%酒精浸泡 10s-30s，取出后立即用大量无菌水冲洗 3-5 遍，然后放入 0.1% HgCl_2 浸泡 6-10min，结束后立即用大量无菌水冲洗 3-5 遍，之后将外植体放在无菌滤纸上吸干水份，并用无菌手术刀将叶脉切掉；

步骤 2、金龙胆草叶片单细胞分离：用 70%酒精喷施牛肚匀浆器灭菌，带酒精挥发干后，备用；采用机械法分离单细胞，将处理好的叶片转入含有 STN 缓冲液的无菌牛肚匀浆器中，快速研磨匀浆，匀浆时间为 0.5-1.5min；过无菌细胞筛，无菌细胞筛的筛目数为 180-220 目，收集金龙胆草离体单细胞；

步骤 3、建立金龙胆草悬浮细胞系：吸取机械分离得到的细胞液，接种于悬浮细胞培养液中，接种后的培养液置于摇床中培养，培养温度为 25℃，转速为 100-120rpm，采用 SCAR 鉴定该悬浮细胞是否为金龙胆草悬浮细胞；

步骤 4、稳定继代培养：吸取鉴定为金龙胆草亲代悬浮细胞系，转入新的悬浮培养液中培养 3 天；

所述悬浮细胞培养液为 MS+蔗糖 $30\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +6-BA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +KT $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +甘露醇 0.3M，pH 值为 5.5。

2. 根据权利要求 1 所述的金龙胆草离体细胞的培养方法，其特征在于，所述步骤 1 中的外植体的灭菌条件为：先用 70%酒精浸泡 10s，然后再用 0.1% HgCl_2 浸泡 8min。

3. 根据权利要求 1 所述的金龙胆草离体细胞的培养方法，其特征在于，所述步骤 2 中的 STN 缓冲液的 pH 为 7.5。

~~4. 根据权利要求 1 所述的金龙胆草离体细胞的培养方法，其特征在于，所~~

权 利 要 求 书

~~述步骤3中的匀浆时间为0.5-1.5min，无菌细胞筛的筛目数为180-220目。~~

~~5. 根据权利要求1所述的金龙胆草离体细胞的培养方法，其特征在于，所述步骤3中的培养温度为25℃，转速为100-120rpm。~~