

ICS 19.020
M731

T/GXDSL

团 体 标 准

T/GXDSL 031—2024

药用植物毛状根高通量培养技术规程

Technical Regulations for High-throughput Culture of Hairy Roots of Medicinal
Plants

2024 - 12 - 28 发布

2024 - 12 - 29 实施

广西电子商务企业联合会 发布

目 次

前 言	II
一、范围	1
二、规范性引用文件	1
三、术语和定义	1
四、实验室设施与环境	1
1. 设施布局	2
2. 环境参数	2
3. 人员资质与培训	2
五、材料与试剂	2
1. 药用植物材料	3
2. 发根农杆菌菌株与培养基	3
六、培养技术流程	3
1. 发根农杆菌的活化与培养	3
2. 毛状根的诱导与筛选	3
3. 毛状根的高通量培养	4
七、质量控制	4
1. 培养物的无菌检测	4
2. 毛状根的生长指标检测	4
3. 次生代谢产物的含量测定	5
4. 数据管理与保存	5
5. 培养物的检测	5
6. 培养基及培养条件的监测	5
7. 次生代谢产物的检测	6
8. 微生物污染检测	6
八、质量标准制定	6
九、附则	7

前 言

本文件依据GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西产学研科学研究院提出。

本文件由广西电子商务企业联合会归口。

本文件起草单位：广西研科院高新技术有限公司，广西产学研科学研究院，广西研科院传媒有限公司，广西壮族自治区农业科学院园艺研究所，容县农业科学研究所，广西容县农乐农业科技有限公司，容县大藤树餐饮有限公司，广西泽灵科技有限公司。

本文件主要起草人：庄文斌，周伯韬，甘汉才，周广，梅华，赖桂华，莫朝森，黄丽萍，张婷梁标，刘福平，曾少兰，李健，林松，梁勇，黄云，赖业明，黎雄。

本文件为首次发布。

药用植物毛状根高通量培养技术规程

一、范围

本标准规定了药用植物毛状根高通量培养的实验室设施与环境要求、人员资质与培训、材料与试剂、培养技术流程、质量控制、数据管理与保存等方面的技术规范。适用于各类药用植物毛状根的高通量培养研究与生产实践。

二、规范性引用文件

- GB 50457-2019 《医药工业洁净厂房设计规范》
- GB/T 6682-2008 《分析实验室用水规格和试验方法》
- NY/T 1281-2007 《花卉植物组织培养技术规程》

三、术语和定义

• 药用植物毛状根：由发根农杆菌介导，将其 Ri 质粒上的 T-DNA 整合到药用植物细胞基因组中诱导产生的特殊不定根，具有生长迅速、遗传稳定、次生代谢产物合成能力强等特点。

• 高通量培养：利用自动化、微型化、集成化的培养设备与技术体系，在短时间内对大量药用植物毛状根培养物进行同步、高效培养与监测的方法。

四、实验室设施与环境

1. 设施布局

- 实验室应划分接种区、培养区、检测区等功能区域，各区域之间应有效隔离，避免交叉污染。接种区应配备超净工作台、紫外灯等灭菌设备，洁净度等级应达到 100 级。

- 培养区应具备温度、湿度、光照、气体浓度等环境参数自动调控功能，安装通风换气系统与空气净化装置，保持空气清新，减少微生物与尘埃粒子污染。

2. 环境参数

- 温度控制在 $22^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C}$ ，精度为 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ；相对湿度维持在 40% - 60%，精度为 $\pm 5\%$ 。光照强度根据药用植物种类设定在 $1000 \text{ lx} - 5000 \text{ lx}$ 之间，光照周期为 12 h - 16 h 光照/8 h - 12 h 黑暗。

- 培养室内二氧化碳浓度控制在 $300 \text{ ppm} - 800 \text{ ppm}$ ，氧气浓度不低于 20%，通过气体传感器与通风设备实时监测与调节。

3. 人员资质与培训

- 从事药用植物毛状根高通量培养的技术人员应具有生物学、药学、生物技术等相关专业本科及以上学历，或具有同等专业技术水平与实践经验。

- 定期组织人员参加专业培训，内容包括无菌操作技术、植物组织培养原理与方法、仪器设备使用与维护、质量控制与数据分析等，培训时间不少于 40 学时/年。

五、材料与试剂

1. 药用植物材料

- 选择健康、无病虫害的药用植物种子、幼苗、叶片、茎段等作为外植体材料。采集后应进行预处理，如清洗、消毒、表面灭菌等操作，消毒试剂可选用 70% - 75%酒精、0.1% - 0.2%升汞溶液等，消毒时间根据材料类型与污染程度确定，一般为 30 s - 10 min。

2. 发根农杆菌菌株与培养基

- 选用适宜的发根农杆菌菌株，如 A4、R1601 等，购自专业菌种保藏机构或经鉴定的实验室自行保存菌株。

- 培养基应根据药用植物种类与培养目的进行优化配置，常用的基本培养基有 MS、B5、White 等，添加适量的生长素、细胞分裂素、氨基酸、维生素、蔗糖、琼脂等成分，pH 值调节至 5.5 - 6.5。

六、培养技术流程

1. 发根农杆菌的活化与培养

- 从甘油保存菌种中取少量发根农杆菌接种于 LB 固体培养基平板上，在 28° C 培养箱中倒置培养 24 h - 48 h，待菌落长出后，挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中，在 28° C、150 r/min - 200 r/min 条件下振荡培养至对数生长期，菌液浓度达到 $10^8 - 10^9$ cfu/mL。

2. 毛状根的诱导与筛选

- 将预处理后的药用植物外植体与活化后的发根农杆菌菌液共培养，共培养时间为 10 min - 60 min，共培养温度为 22° C - 25° C。共培养结束后，将外植体转移至筛选培养基上，筛选培养基添加

适量抗生素以抑制农杆菌生长，培养 2 - 4 周后，观察外植体上毛状根的诱导情况，筛选出生长迅速、形态正常的毛状根。

3. 毛状根的高通量培养

- 采用生物反应器进行毛状根高通量培养，生物反应器类型可选择气升式、搅拌式、鼓泡式等。根据生物反应器容积与毛状根生长特性确定接种量，一般为 10% - 30% (v/v)。

- 培养过程中，通过在线监测系统实时监测温度、pH 值、溶解氧、电导率等参数，并根据设定阈值自动调控。定期取样检测毛状根的生长状况与次生代谢产物含量，培养周期根据药用植物种类与培养目的确定，一般为 2 - 8 周。

七、质量控制

1. 培养物的无菌检测

- 定期取少量毛状根培养物，采用平板划线法或稀释涂布平板法接种于 LB 固体培养基与 PDA 固体培养基上，分别在 28° C 与 25° C 培养 2 - 3 天，观察有无细菌与真菌污染菌落生长，无菌检测频率为每周 1 - 2 次。

2. 毛状根的生长指标检测

- 每隔 3 - 5 天测量毛状根的鲜重、干重、根长、分支数等生长指标，计算生长速率与增殖倍数。生长速率公式： $GR = (W2 - W1) / (t2 - t1)$ ，其中 GR 为生长速率，W1、W2 分别为两次测量的鲜重或干重，t1、t2 为对应的时间；增殖倍数公式： $PF = N2 / N1$ ，其中 PF 为增殖倍数，N1、N2 分别为初始与最终的毛状根数量。

3. 次生代谢产物的含量测定

- 采用高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）、质谱法（MS）等分析技术测定毛状根中次生代谢产物的含量。建立标准曲线，计算样品中次生代谢产物的浓度，含量测定频率为每培养周期 2 - 3 次。

4. 数据管理与保存

- 建立完善的数据管理系统，实时记录培养过程中的环境参数、操作记录、检测数据等信息，数据记录应准确、完整、可追溯。

- 数据保存时间不少于 5 年，采用电子文档与纸质文档双重备份方式，电子文档存储在专用服务器或硬盘中，定期进行数据备份与更新；纸质文档分类整理归档，存放在干燥、通风、防虫的档案室。

5. 培养物的检测

- 形态与生长状况检测：定期观察毛状根的形态特征，包括根的长度、直径、分支数量、颜色及质地等，并记录生长数据，绘制生长曲线，以便及时掌握毛状根的生长动态。正常的毛状根应呈现白色或淡黄色，质地紧密，分支发达。

- 遗传稳定性检测：运用分子生物学技术，如 PCR、Southern 杂交等，定期检测毛状根的遗传稳定性，确保其在长期培养过程中 Ri 质粒中的 T-DNA 稳定整合于植物基因组中，未发生丢失、重排或突变等现象，维持稳定的次生代谢产物合成能力。

6. 培养基及培养条件的监测

- 营养成分监测：定期检测培养基中的大量元素、微量元素、碳源、氮源等营养成分的含量，确保其浓度在适宜范围内，为毛状根生长和次生代谢产物合成提供充足的营养支持。

- 理化性质监测：实时监测培养基的 pH 值、温度、溶氧浓度等理化参数，使其严格控制在设定范围内。如 pH 值应保持在 5.5-6.5，溶氧浓度控制在 50%-80%饱和度，以保障毛状根的正常生长和代谢。

7. 次生代谢产物的检测

- 含量检测：采用高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱法（GC）、质谱法（MS）等分析方法，定期检测毛状根及培养液中次生代谢产物的含量，如药用植物中的生物碱、黄酮类、萜类等活性成分，建立含量变化曲线，为优化培养条件提供依据。

- 成分分析：对次生代谢产物进行成分分析，确保所合成的次生代谢产物种类符合预期，且无异常成分出现。同时，关注产物中杂质的含量，保证产品的质量和安全性。

8. 微生物污染检测

- 定期抽检：定期对培养物进行微生物检测，包括细菌、真菌和病毒等的检测。采用平板划线法、稀释涂布平板法等方法，检测培养基和毛状根表面的微生物菌落数量，确保无菌生长。

- 污染处理：一旦发现微生物污染，应立即采取相应的处理措施，如对污染的培养物进行隔离、销毁，对培养环境和设备进行彻底消毒等，防止污染扩散。

八、质量标准制定

- 制定质量指标：根据药用植物的种类、用途及相关法规要求，制定毛状根培养物及其次生代谢产物的质量标准，包括外观、纯度、含量、杂质限度等指标，确保产品质量符合药用标准。

- 质量认证：建立质量认证体系，对培养过程和产品质量进行严格的审核和认证，确保质量控制措施的有效实施和产品质量的稳定可靠。

九、附则

- 本标准自发布之日起实施。
 - 本标准在药用植物毛状根高通量培养领域具有创新性，通过规范的技术流程与严格的质量控制，填补了当前该领域缺乏统一标准的空白，为药用植物毛状根培养技术的标准化、规模化应用提供了前瞻性的指导依据，有助于推动药用植物生物技术产业的发展。
-

全国团体标准信息平台