

T/GXDSL

团 体 标 准

T/GXDSL 000—2024

## 药用植物毛状根高通量培养技术规程

2024 - 00 - 00 发布

2024 - 00 - 00 实施

广西电子商务企业联合会 发布



目 次

前 言 ..... II

一、前言 ..... 1

    1. 目的与意义 ..... 1

    2. 适用范围 ..... 1

二、术语和定义 ..... 1

    1. 毛状根 ..... 1

    2. 发根农杆菌 ..... 1

    3. 高通量培养 ..... 1

三、材料和设备 ..... 2

    1. 实验材料 ..... 2

    2. 仪器设备 ..... 2

四、毛状根培养流程 ..... 2

    1. 发根农杆菌的培养与保存 ..... 2

    2. 药用植物外植体的处理 ..... 3

    3. 针刺接种感染与共培养 ..... 3

    4. 毛状根的诱导与分离 ..... 3

    5. 毛状根的培养与扩繁 ..... 3

五、毛状根高通量培养技术规程 ..... 4

    1. 培养基的选择与配制 ..... 4

    2. 高通量培养系统的搭建 ..... 4

    3. 毛状根的接种与继代培养 ..... 4

六、毛状根鉴定方法 ..... 4

    1. 形态水平鉴定 ..... 4

    2. GUS 活性检测 ..... 4

    3. 冠瘿碱测定 ..... 5

七、毛状根次生代谢产物的提取与分析 ..... 5

    1. 提取方法 ..... 5

    2. 分析方法 ..... 5

八、质量控制与记录管理 ..... 5

    1. 实验记录 ..... 5

    2. 质量控制措施 ..... 5

九、安全与环保要求 ..... 6

    1. 实验室安全 ..... 6

    2. 废弃物处理 ..... 6

## 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：

本文件主要起草人：

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、前言

### 1. 目的与意义

本标准旨在规范药用植物毛状根的高通量培养技术，为相关科研人员和技术人员提供操作指导，确保毛状根培养过程的科学性、一致性和可重复性。通过本标准的实施，可以提高毛状根培养的效率和次生代谢产物的产量，推动药用植物毛状根在科学研究和产业应用中的广泛应用。

### 2. 适用范围

本标准适用于所有需要通过毛状根培养技术进行药用植物次生代谢产物生产的实验室和生产企业。

## 二、术语和定义

### 1. 毛状根

毛状根（Hairy Roots）是通过发根农杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）感染植物细胞，将 Ri 质粒上的 T-DNA 区段整合到植物细胞基因组中诱导产生的转基因根系。

### 2. 发根农杆菌

发根农杆菌是一种革兰氏阴性土壤细菌，能够侵染大多数双子叶植物和少数单子叶植物，诱发被感染植物的受伤部位长出毛状根。

### 3. 高通量培养

高通量培养指利用自动化设备和系统化流程，实现大规模、高效率的毛状根培养。

### 三、材料和设备

#### 1. 实验材料

- 发根农杆菌（含 Ri 质粒）菌株，如 ATCC15834、ATCC39207 等。
- 药用植物外植体，如黄芪、人参、青蒿等无菌苗。
- MS 培养基、YEB 培养基等。

#### 2. 仪器设备

- 超净工作台
- 高压灭菌器
- 生化培养箱
- 恒温摇床
- 离心机
- 解剖显微镜
- 一次性无菌培养皿、试管、三角瓶等玻璃器皿
- 生物反应器（可选，用于大规模培养）

### 四、毛状根培养流程

#### 1. 发根农杆菌的培养与保存

发根农杆菌可在平板培养基上于 4℃ 下保存数月，而在 -70℃ 的低温冰箱中可长期保存。快速生长过程中，常常会出现质粒丢失、基因突变。要使转化最为有效，就要利用对数生长期的农杆菌来转化。具体步骤如下：

1.1 活化菌种：从 -70℃ 冰箱中取出菌种，在 YEB 固体培养基上划线，于 25℃ 恒温培养至单菌落形成。

1.2 制备菌液：挑取单菌落接种于 YEB 液体培养基中，于 25℃、200 rpm 条件下振荡培养至对数生长期（OD<sub>600</sub> ≈ 0.5）。

1.3 菌种保存：将对数生长期的菌液与灭菌甘油按 1:1 比例混合，置于 -70℃ 冰箱中长期保存。

## 2. 药用植物外植体的处理

2.1 种子消毒：将药用植物种子用 70%乙醇浸泡 30 秒，再用 0.1%升汞消毒 10 分钟，无菌水冲洗 5 次，每次不少于 2 分钟。

2.2 种子萌发：将消毒后的种子接种于 MS 培养基上，于 25℃暗培养至幼苗长度约 4cm。

2.3 切取外植体：选取健壮无菌苗的下胚轴作为共培养的材料。

## 3. 针刺接种感染与共培养

3.1 准备菌液：将对数生长期的发根农杆菌菌液重悬于新鲜的 MS 液体培养基中。

3.2 针刺接种：用解剖针蘸取菌液，在下胚轴切段上轻轻划伤，以便农杆菌侵入植物组织。

3.3 共培养：将接种后的外植体转移至含有 500 mg/L 头孢噻肟的 MS 固体培养基上，于 25℃黑暗条件下共培养 2-4 天。

## 4. 毛状根的诱导与分离

4.1 转移到筛选培养基：将共培养后的外植体转移至含有 500 mg/L 头孢噻肟和 50 mg/L 潮霉素的 MS 固体培养基上，于 25℃、16 小时光照/8 小时黑暗条件下培养。

4.2 毛状根的分离：待毛状根长出后，将其从母体组织上切下，并转移到不含抗生素的新鲜 MS 固体培养基上继续培养。

## 5. 毛状根的培养与扩繁

5.1 初步培养：将分离出的毛状根接种到 MS 固体培养基上，于 25℃、16 小时光照/8 小时黑暗条件下培养。

5.2 扩大培养：待初步培养的毛状根长至 2-3 cm 长时，将其转移到液体 MS 培养基中，于 25℃、110 rpm 条件下振荡培养，直至获得足够数量的毛状根。

## 五、毛状根高通量培养技术规程

### 1. 培养基的选择与配制

- 固体培养基：MS 基本培养基，添加 2%蔗糖和适量凝固剂（如琼脂），pH 调整至 5.8，121℃高压灭菌 15 分钟。
- 液体培养基：MS 基本培养基，添加 2%蔗糖，pH 调整至 5.8，121℃高压灭菌 15 分钟。

### 2. 高通量培养系统的搭建

- 2.1 培养容器选择：使用 250 ml 或 500 ml 的三角瓶，或者使用专用生物反应器进行大规模培养。
- 2.2 控制培养条件：设定温度 25℃，光照周期 16 小时光照/8 小时黑暗，光照强度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

### 3. 毛状根的接种与继代培养

- 3.1 接种密度：在液体培养基中的初始接种密度控制在每毫升培养基含有 1-2 个毛状根切段。
- 3.2 继代周期：每 14-21 天继代一次，根据毛状根的生长速度和培养基的状况进行调整。

## 六、毛状根鉴定方法

### 1. 形态水平鉴定

观察诱导出的毛状根是否具备以下特征：

- 不依赖激素快速生长。
- 多分枝、无向地性。
- 存在大量根毛。

### 2. GUS 活性检测

通过 GUS 组织化学染色法检测毛状根中的 GUS 活性，以确认 Ri 质粒是否成功转入植物细胞基因组中。

### 3. 冠瘿碱测定

冠瘿碱是发根农杆菌合成的特有化合物，只能在细菌中表达，因此可通过高压纸电泳或薄层层析法检测冠瘿碱的存在，从而鉴定毛状根的转基因特性。

## 七、毛状根次生代谢产物的提取与分析

### 1. 提取方法

- 根据目标次生代谢产物的性质选择适当的提取方法，如溶剂萃取、超声波辅助提取等。
- 常用溶剂包括甲醇、乙醇、氯仿等。

### 2. 分析方法

- 高效液相色谱法（HPLC）
- 气相色谱法（GC）
- 质谱法（MS）
- 核磁共振波谱法（NMR）

## 八、质量控制与记录管理

### 1. 实验记录

详细记录每一步骤的操作过程、实验条件和结果，确保实验数据的完整性和可追溯性。

### 2. 质量控制措施

定期校准实验仪器，确保实验数据的准确性；严格控制无菌操作条件，避免微生物污染；严格按照标准操作规程进行操作，确保实验结果的一致性和可重复性。

## 九、安全与环保要求

### 1. 实验室安全

严格遵守实验室安全操作规程，穿戴适当的防护装备，如实验服、手套、护目镜等；正确处理废弃物，避免对环境造成污染。

### 2. 废弃物处理

实验过程中产生的废弃物应按照相关规定进行分类收集和处理，特别是生物废弃物需经高温高压灭菌后才能丢弃。

---