|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png CS |   B 05 |

中国商品学会团体标准

T/CS XXXX—XXXX

自发光植物培育工艺技术规范

Technical Specifications for the Cultivation Process of Night Self-Luminous Plants

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

中国商品学会  发布

目次

[前言 II](#_Toc190956458)

[1 范围 1](#_Toc190956459)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc190956460)

[3 术语和定义 1](#_Toc190956461)

[4 试验试剂、仪器设备及耗材 1](#_Toc190956462)

[5 培育工艺技术流程 2](#_Toc190956463)

[6 安全评估 3](#_Toc190956464)

[7 隔离措施 4](#_Toc190956465)

[8 应急措施 5](#_Toc190956466)

[9 监督评估 5](#_Toc190956467)

1. 前言

本文件按照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。

本文件由合肥神笔生物科技有限公司提出。

本文件由中国商品学会归口。

本文件起草单位：合肥神笔生物科技有限公司。

本文件主要起草人：。

自发光植物培育工艺技术规范

* 1. 范围

本文件规定了自发光植物培育工艺的试验试剂、仪器设备及耗材、培育工艺技术流程、安全评估、隔离措施、应急措施、监督评估。

本文件适用于利用转基因技术培育以 Hisps、Cph、H3h、Luz 基因为基础的自发光植物。

* 1. 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

自发光植物 Self - luminous plants

通过基因工程手段，将特定的发光基因导入植物基因组，使其在无需外源添加发光底物的情况下，能在黑暗环境中自发产生可见荧光的植物。

载体 vector

用于携带目的基因进入植物细胞的工具，如双元表达载体 pCAMBIA2300，其包含启动子、终止子、抗性基因和多克隆位点等元件。

目的基因 target gene

用于构建自发光植物的 Hisps、Cph、H3h、Luz 基因，来源于南比新假革耳，在真菌生物发光系统中参与荧光素合成与发光过程。

* 1. 试验试剂、仪器设备及耗材
     1. 试剂

试验试剂包括：

1. 物激素类：IAA、GA3、IBA、6-BA、2,4-D、KT、NAA、CK等；
2. 抗生素类：硫酸卡那霉素、利福平、头孢霉素、羧苄青霉素、除草剂Bar、氨苄青霉素钠等；
3. 培养基：固体MS（不含蔗糖和琼脂）、蔗糖、琼脂、植物凝胶、葡萄糖、活性炭、酵母提取物、胰蛋白胨（OXOID）、氯化钠等；
4. 其它药剂：噻苯隆、次氯酸钠、乙酰丁香酮、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、过氧化氢、二甲基亚砜、丙三醇等。
   * 1. 试剂盒

植物总 RNA 抽提纯化试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、反转录试剂盒、质粒小提试剂盒等。

* + 1. 菌株及引物

大肠杆菌 DH5α、农杆菌 LBA4404、Hisps、Cph、H3h、Luz 克隆引物、pCAMBIA2300 载体、CaMV35S扩增引物。

* + 1. 仪器设备

万分之一电子天平、恒温水浴锅、冰箱、PCR仪、电泳仪、凝胶成像仪、灭菌锅、超净工作台、核酸蛋白测定仪、光照培养箱、NanoDrop2000 分光光度计、涡旋振荡仪、恒温摇床、紫外分光光度计、pH计、超低温冰箱、小型高速离心机、高速离心机、磁力搅拌器、制冰机、超纯水机等。

* + 1. 耗材

组培瓶、不同规格一次性培养皿、玻璃培养皿、封口膜、皮筋、无纺布、烧杯、量筒、玻璃棒、涂布棒、称量纸、滤纸、镊子、剪刀、酒精灯、不同规格离心管、不同规格锥形瓶、广口瓶、喷壶、离心管架等。

* 1. 培育工艺技术流程
     1. 目的基因克隆

以目的基因片段 mRNA 为模板，利用反转录试剂盒合成 cDNA 第一链，特异性引物引导DNA聚合酶在体外快速复制特定的DNA片段合成新的 DNA 链。在基因克隆过程中确保目的基因序列的完整性和准确性，辅助元件和抗性基因筛选满足高效表达的基本要求。

* + 1. 载体构建
       1. 原则

构建载体要遵循分子生物学基本原则，确保基因插入位点的正确性；同时选择适当的筛选标记，满足后续遗传转化和阳性鉴定；在构建载体时应进行质粒纯化和验证阶段。

* + - 1. 目的片段的连接与转化

使用限制酶对载体进行双酶切，将胶回收的目的基因片段通过同源重组法连接到经过双酶切的载体上，将连接产物转化至 DH5α 大肠杆菌感受态中，并挑取单菌落进行 PCR 鉴定，选取片段大小正确的单克隆菌落进行摇菌，后将该菌液送至通用生物公司测序。

* + - 1. 重组质粒的提取

将测序结果正确的 200 µl 菌液置于 40 ml 含有卡那霉素抗性（Kan）的 LB 液体培养基中 37 ℃摇床过夜培养，按质粒 DNA 小提试剂盒说明书提取质粒，并使用浓度仪检测其浓度和纯度。

* + - 1. 重组质粒转化农杆菌

选取浓度和纯度高的质粒，按说明书将质粒转化至 LBA4404 农杆菌感受态中，挑取单菌落进行 PCR 鉴定，鉴定单克隆菌落条带大小正确的菌落进行测序验证，测序结果正确的菌落即为阳性重组质粒。

* + 1. 植物组培体系建立

选取不同观赏植物的茎、叶、花等器官作为外植体，采用 70%～75% 酒精消毒、灭菌水冲洗、0.1% 次氯酸钠或 0.1% 生汞处理、无菌水冲洗的脱毒方法。脱毒后的外植体接种于不同培养基，通过正交试验建立组培苗再生体系，获取无菌组培苗。

* + 1. 自发光植物遗传转化
       1. 菌种活化

将含质粒的农杆菌 LBA4404 在 LB 固体培养基（含 50 mg/L Km 和 50 mg/L Rif）划线或均匀涂抹后，28 ℃ 培养 2 d。

用枪头或圆头牙签挑取平板上生长良好的单克隆菌落，放入 50 mL 液体 LB（含 50 mg/L Km 和 50 mg/L Rif）培养基中，28 ℃、220 rpm 在摇床中振荡培养至 OD 600 值 0.4～0.8。

常温下，5 000 rmp 离心 8 min 后倒掉上清液，在无菌滤纸上倒扣离心管，将上清液去除。

用MS液体将菌液的沉淀悬浮，悬浮后活化培养 1 h。

* + - 1. 农杆菌介导法遗传转化

以无菌组培苗为受体，预培养后放入农杆菌侵染液侵染 10～20 min，接种于共培养培养基 2～3 d，再转接至筛选培养基，使伤口与培养基充分接触，光照培养，间隔 15～25 d 更换一次培养基，长出再生苗后壮苗生根。组培苗及侵染条件为 25 ℃±2 ℃，pH 5.8～6.2，光照强度 800～1 200 lx，光照周期 16 h 光照 8 h 黑暗。

* + 1. 阳性克隆鉴定

对侵染后的再生苗单株取样，采用 CTAB 法提取转基因植株叶片的 DNA，通过 PCR 检测和表型鉴定筛选阳性转基因植株。阳性植株收获后种植得 T1 代，以此类推获得 T2 代纯系植株，同时进行分子检测验证目标基因整合与表达。

* + 1. 培养与再生

根据培养阶段和材料种类优化培养基，对再生转基因植株继代扩繁，严格控制培养条件，保障植株正常生长。

* + 1. 遗传稳定性检测

对再生植株组培苗进行分子检测、发光强度定量分析和多代遗传稳定性检测，评估目标基因的稳定遗传情况。

* + 1. 田间试验及质量控制

转基因材料用专用种子袋和穴盘包装，标签明确。

选择肥沃、排水好、无污染土地作为试验区，人工点播种植。

生长期间统一科学管理，定点定量施肥浇水，防虫防病，剔除弱苗。4 月下旬用乐果防治蚜虫。

收获时人工统一收获，种子冷库保存，残留部分整地做堆肥。试验遵循法规标准，评价植株性状和环境适应性，统计分析试验数据。

* + 1. 功能鉴定

阳性植株应具备自发光特性，在夜晚自发荧光，具备较高观赏和经济价值。

* 1. 安全评估
     1. 转基因植物安全性评价

目的基因表达无特异性，所用启动子和终止子通用，载体无致病性。

转基因植物遗传性状稳定，与受体植物相比，适应性、致病性等特征未改变，对生态系统无影响，不改变土壤微生物群落，可以确保生态系统的稳定与可持续性。

本试验转基因植物不应对生态系统产生影响，不改变土壤微生物群落。

对转基因植株的生长状况、发光时长、发光强度等多项指标进行评估，确保与非转基因植株在安全性能上无显著差异，确保对人体健康无潜在风险。

应遵循相关规定，进行自发光转基因植物的申报、审批流程。

通过公开透明的监督评估过程，增加公众对转基因植物的了解，提高其对转基因技术的信任度。

* + 1. 实验室安全
       1. 仪器设备安全

实验室应防火防爆、规范使用酒精灯、保障用电安全、远离火源及电源、保持消防通道畅通、定期检验仪器、规范操作高温、高速旋转设备。高速旋转仪器设备应保证配平，通风柜使用前应进行检查，在距离通风柜内至少 15 cm 的地方进行作。应注意无菌操作间和紫外灯使用安全。

* + - 1. 药品试剂安全

防毒：实验前应了解药品毒性及防护措施；在通风橱内进行有毒气体操作；剧毒药品应妥善保管，避免与皮肤接触。

防爆：使用可燃性气体时，应防止气体逸出，避免明火，室内通风应良好；部分药品受震和受热易引起爆炸，应小心使用；不应将强氧化剂和强还原剂存放一起；进行容易引起爆炸的实验，应有防爆措施。

防火：有机溶剂使用时避免明火、电火花和静电放电，应及时回收处理，防止自燃。部分物质在空气中易氧化自燃，应隔绝空气保存。

防灼伤：强酸、强碱、强氧化剂、冰醋酸等会腐蚀皮肤，液氧、液氮等低温会灼伤皮肤，不应随意混合、加热。

* + 1. 试验地安全监控
       1. 环境监控

温度与湿度监控：使用温湿度传感器对试验地的温度和湿度进行实时监测。根据研究需求设定适宜的温湿度范围，并确保环境控制系统能够稳定维持这些条件。

光照监控：使用光照传感器测量试验地的光照强度和光照周期。根据植物的生长需求和研究目的，调整光照条件以提供最佳的光照环境。

空气质量监控：使用空气悬浮微生物采样器或空气质量检测仪对试验地的空气质量进行监测。定期检测空气中的微生物数量、尘埃颗粒和其他污染物，确保空气质量符合研究要求。

* + - 1. 植物生长监测

生长状态监测：定期检查作物的生长状态，包括株高、叶面积、生长速度等指标。使用专业的生长监测仪器进行精确测量，并记录数据以便后续分析。

病虫害监控：定期检查作物是否受到病虫害的侵害。使用病虫害监测工具和方法进行早期预警和防治。

转基因作物监控：对转基因作物的生长和表达情况进行定期检测。使用基因检测技术监测转基因作物的遗传稳定性和表达效率。

* + - 1. 数据记录与分析

实验记录：在实验过程中详细记录实验操作步骤、试剂使用情况、仪器参数等。确保实验记录的可追溯性和结果可复现性。

数据记录：建立完善的试验数据记录系统，详细记录试验过程中的各项数据。

数据分析：使用专业的数据分析软件对收集到的数据进行处理和统计分析，包括温湿度、光照、空气质量等环境数据以及作物生长和转基因表达数据。根据分析结果调整实验条件或优化研究方法，以得出准确的结论。

* + - 1. 安全监控

安装安全监控摄像头，对试验地进行全方位、全天候的监控。配备报警系统，当发生异常情况时，能够立即发出警报并采取相应的应急措施。试验地的监控年限属于试验全年间不间断无死角监控。

* 1. 隔离措施
     1. 物理隔离

在试验地周围设置围栏或围墙，入口设置门禁系统，设置明显的警示标志，设置隔离种植带隔栏带。

* + 1. 生物隔离

对进出试验区域的人员、设备和物品进行消毒处理；采取防虫防鼠措施，设置防虫网、使用灭鼠药等，以防止昆虫和鼠类等动物进入试验区域；对于植物试验，采取隔离种植措施，如设置隔离带、使用无菌土壤等，以防止病原体或有害微生物的传播。

* + 1. 信息隔离

应对试验过程中产生的数据进行保密；对试验区域内的信息进行实时监控，及时发现并处理异常活动或潜在的安全风险。

* + 1. 其他措施

对试验区域内的环境进行严格控制，如温度、湿度、光照等，以确保试验条件的稳定性和一致性。

定期对试验区域进行安全巡查，检查围栏、门禁系统、警示标志等是否完好有效，及时发现并处理安全隐患。

制定应急预案，针对可能出现的突发事件或紧急情况，如火灾、泄露等，进行及时有效的应对。

试验地的隔离措施应综合考虑物理、生物、信息等多个方面，以确保试验结果的准确性和安全性。同时，这些措施应根据试验的具体需求和实际情况进行灵活调整和优化。

试验地周围留有边界标记，设立警示牌和空白隔离带；明确试验区监控人员，并配备紧急联系方式。

* 1. 应急措施
     1. 人员安全监控

对进入试验地的人员进行健康监测，如体温检测、手部消毒等，确保人员遵守无菌操作规范，防止交叉污染；对于人身安全问题，制定详细的应急预案，包括人员疏散、设备关闭、报警求助等步骤；定期进行应急演练，提高员工的应急处理能力和安全意识。

* + 1. 环境异常处理

当环境参数超出设定范围时，立即启动应急处理机制。调整环境控制系统以恢复适宜的环境条件，并记录异常情况以便后续分析。

* + 1. 生物安全事件处理

在发生生物安全事件时，如微生物泄漏或人员感染，立即启动应急预案。采取必要的隔离、消毒和救治措施，防止事件扩大和扩散。

* + 1. 其他安全措施

试验结束后，由试验区负责人观察调查，铲除收获后残留材料，一年时间内该地区不再种植非转基因材料，第二年继续检查，如发现有残留转基因材料，及时清理，并做相应记录。如遇到意外释放应立即回收并销毁意外释放的转基因植株材料，如遇到无法回收情况则对意外释放的地点进行标记并进行监控，以铲除或销毁转基因植株材料。

* 1. 监督评估
     1. 风险评估

在转基因植物商业化之前，进行全面的风险评估，包括植物安全性评估、生物安全评估、环境影响评估、人员安全评估等。

* + 1. 标签制度

实施转基因品种标签制度，让消费者了解产品是否含有转基因成分，以便自主选择。

* + 1. 监管机构

建立专门的转基因植物监管机构，负责监督评估工作的实施，确保评估过程的公正性与科学性。

* + 1. 合作监督

加强企业间在转基因植物监督评估方面的合作，共享信息、交流经验，提高宽范围内的监管水平。

