

ICS\*\*, \*\*\*, \*\*  
C\*\*



# 团 体 标 准

T/CACM \*\*\*\*—20\*\*

## 药用植物细胞培养技术规程

Technical regulation of medicinal plant cell culture

（文件类型：公示稿）

20\*\*-\*\*-\*\*发布

20\*\*-\*\*-\*\*实施

中华中医药学会 发布

# 目 次

前 言 .....	IV
引 言 .....	V
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
3.1 药用植物细胞培养 .....	1
3.2 外植体 .....	1
3.3 培养基 .....	1
3.4 接种 .....	1
3.5 初代培养 .....	1
3.6 继代培养 .....	1
3.7 细胞系 .....	2
4 工作区条件 .....	2
4.1 洗涤间 .....	2
4.2 消毒间 .....	2
4.3 培养基制备间 .....	2
4.4 接种间 .....	2
4.5 培养间 .....	2
4.6 细胞保存间 .....	2
5 清洗与灭菌 .....	2
5.1 清洗 .....	2
5.1.1 普通器皿及器械清洗 .....	2
5.1.2 初次使用器皿及器械清洗 .....	2
5.1.3 污染器皿及器械清洗 .....	3
5.2 灭菌 .....	3
5.2.1 器皿及器械灭菌 .....	3
5.2.2 培养基灭菌 .....	3
5.2.3 外植体灭菌 .....	3
6 试剂与培养基 .....	3
6.1 水 .....	4
6.2 消毒灭菌剂 .....	4
6.3 培养基 .....	4
6.3.1 无机营养物 .....	4
6.3.2 有机营养物 .....	4
6.3.3 维生素类 .....	4
6.3.4 植物生长调节物质 .....	4
6.3.5 有机附加成分 .....	4
6.3.6 固化剂 .....	5
6.4 培养基配置 .....	5
6.4.1 培养基母液配制和保存 .....	5

6.4.2 培养基配制、灭菌和保存 .....	5
6.4.2.1 培养基配制 .....	5
6.4.2.2 培养基灭菌 .....	5
6.4.2.3 培养基保存 .....	5
7 药用植物细胞培养与保存 .....	5
7.1 外植体的选择及处理 .....	5
7.1.1 外植体选择 .....	5
7.1.2 外植体的表面灭菌 .....	6
7.2 接种 .....	6
7.2.1 操作准备 .....	6
7.2.2 接种期间器械灭菌 .....	6
7.2.3 接种 .....	6
7.2.4 记录 .....	6
7.3 药用植物细胞的初代培养 .....	6
7.4 药用植物细胞的继代培养 .....	6
7.5 药用植物细胞的保存 .....	6

## 前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本文件由珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心，中国中医科学院中药资源中心，大连普瑞康生物技术有限公司，广西药用植物园，安徽中医药大学，大连源盛泰医疗投资股份有限公司、北京同仁堂健康药业有限公司、浙江中医药大学。

本文件主要起草人：黄璐琦、刘汉石、袁媛、刘雅萍、秦双双、刘禹、李晓琳、谢冬梅、陈梓、金银兵、赵玉洋、张显林、周骏辉、吴俊罡、赵乔、黄利、张宏、朱爱松。

## 引言

利用生物技术保护模式获取中药材补充资源,是解决我国珍稀濒危药用植物资源日趋枯竭、市场需求却日益强劲这一矛盾的有效途径。药用植物高产稳定细胞是指在人工控制条件下高密度大量培养的药用植物细胞,具有成分清楚、功效明确、质量稳定、生产成本低、生产周期短等特点。作为一种生物技术补充资源,药用植物高产稳定细胞已广泛应用于科学研究,并成为新食品、保健品、化妆品等原料,形成以药用植物细胞原料为基础的大健康产业。本文件旨在建立药用植物细胞培养技术规程,对于指导和规范科学研究和生产中的药用植物细胞培养具有重要意义。

# 药用植物细胞培养技术规程

## 1 范围

本文件规定了药用植物细胞培养过程中的条件和技术方法。

本文件适用于生产和科学研究中的苔藓植物、蕨类植物、种子植物中的药用植物细胞的培养。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程

DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程

## 3 术语和定义

### 3.1 药用植物细胞培养 **medicinal plant cell culture**

在离体条件下对药用植物的器官、组织、细胞、原生质体等进行培养使其增殖的技术。

### 3.2 外植体 **explant**

药用植物细胞培养中用于离体培养材料的器官、组织、细胞、原生质体等。

### 3.3 培养基 **medium**

根据植物营养原理和植物细胞培养技术要求，由不同营养物质组合的人工配制的营养基质。

### 3.4 接种 **inoculation**

在无菌条件下，将经过表面消毒处理的外植体切割后转接到培养基上的过程。

### 3.5 初代培养 **explant culture**

外植体经表面消毒后接种于培养基上，细胞开始增殖、脱分化，获得最初培养材料的过程。

### 3.6 继代培养 **subculture**

外植体经初代培养后，经过若干次转接于新培养基上，并持续培养多代的过程。

### 3.7 细胞系 cell line

从外植体培养（包括初代培养和继代培养）产生的可长期连续传代的细胞群体。

## 4 工作区条件

工作区一般由洗涤间、消毒间、培养基制备间、缓冲间、接种间、培养间和细胞保存间组成。

### 4.1 洗涤间

配置水槽、工作台等，地面应防水、防滑，水槽处墙面应防水。

### 4.2 消毒间

配置排风及灭火设备，配备高压蒸汽消毒器、鼓风干燥箱等设备。工作规模较小或空间有限时，洗涤间和消毒间可合并。

### 4.3 培养基制备间

应有适宜空间及配套工作台，配置存放化学试剂的药品柜、危险品柜及存放培养、接种器皿的器械柜，并配备电子天平、超纯水装置、磁力搅拌器等设备。

### 4.4 接种间

由里外两间组成，外间是缓冲间，里间为接种间。缓冲间面积应不小于 3 m<sup>2</sup>，应配备紫外灯、洗手池、更衣柜等。接种间门窗应密封防尘，地面和墙壁平整光滑，便于清洁和消毒。空调、除湿机、温湿度测量装置，以控制培养温度、湿度。配备超净工作台或生物安全柜等设备。

### 4.5 培养间

培养间地面、墙面要求同 4.4。配备空调、除湿机、温湿度测量装置，以控制培养温度和湿度。如必要可配备一个通气窗，并安装排风扇；配备光照控制系统、紫外灯、光照培养架、暗培养柜（或培养箱）、摇床等，可实现暗培养和可控的光照培养。

### 4.6 细胞保存间

细胞保存间门窗、地面、墙面及配置要求同4.5，此外还需配置冰箱和液氮生物容器，用于稳定的药用植物细胞的常温、低温或超低温保存。

## 5 清洗与灭菌

### 5.1 清洗

#### 5.1.1 普通器皿及器械清洗

普通器皿和器械的清洗包括浸泡、刷洗、冲洗、干燥四个步骤。

- (1) 浸泡：用洗涤剂（肥皂水、洗洁精等）浸泡 6~24 h；
- (2) 刷洗：用软毛毛刷反复刷洗；
- (3) 冲洗：用清水冲洗 3~5 次，再用双蒸水冲洗 3~5 次，直至器皿内外壁无明显污渍；
- (4) 干燥：60℃下烘干或倒置晾干。

### 5.1.2 初次使用器皿及器械清洗

初次使用的玻璃器皿及器械在经浸泡、刷洗后应置于5%的盐酸溶液中浸泡12~24 h，然后按6.1.1进行。

初次使用的塑料和橡胶器皿及器械在经浸泡、刷洗后，需用2%的NaOH溶液浸泡12 h，冲洗、干燥后用1%盐酸浸泡30 min，再冲洗、干燥。冲洗、干燥按6.1.1执行。

### 5.1.3 污染器皿及器械清洗

污染器皿及器械应先按 6.2.1 的要求高压蒸汽灭菌后，倒掉污染物，再按 6.1.1 的要求清洗。清洗不掉的严重污垢应置于 4%的重铬酸钾洗液浸泡 4~24 h，再按照 6.1.1 进行冲洗、干燥。

## 5.2 灭菌

### 5.2.1 器皿和器械灭菌

塑料和橡胶材质的器具应在 0.073 MPa 的压力下高压蒸汽灭菌 10 min。其余器皿及器械应在 121℃、0.105 MPa 的压力下高压蒸汽灭菌 15~30 min。

### 5.2.2 培养基灭菌

培养基灭菌分为高压蒸汽灭菌和过滤除菌。培养基通常采用高压蒸汽灭菌，即在 121℃、0.105MPa 下高压灭菌 15~20 min。过滤除菌常用于液体培养基或培养基母液的除菌，可将培养基全部过滤除菌，也可将热不稳定的成分单独溶解后过滤除菌，再添加到经过高压蒸汽灭菌后的培养基中。

### 5.2.3 外植体表面灭菌

外植体的表面灭菌应在超净台中，按LY/T 1882-2010中5.2执行。

## 6 试剂与培养基



## 6.1 水

实验用水符合 GB/T 6682 一级用水的要求。

## 6.2 消毒灭菌剂

乙醇、次氯酸钠、氯化汞、84消毒液、新洁尔灭、高锰酸钾、抗生素等。

## 6.3 培养基

### 6.3.1 无机营养物

Ca、K、Mg、N、P 和 S 等大量元素，配制浓度通常为毫摩尔每升数量级；B、Co、Cu、Fe、I、Mo、Mn 和 Zn 等微量元素，配制浓度通常为微摩尔每升数量级。

### 6.3.2 碳水化合物

碳水化合物常用蔗糖，也可选用葡萄糖、麦芽糖、果糖、乳糖、半乳糖、山梨醇、甘露糖等，还可食用白砂糖代替。

### 6.3.3 维生素类

通常用硫胺素、盐酸吡哆素、烟酸和肌醇等。

### 6.3.4 植物生长调节物质

①生长素类 1-萘乙酸 (NAA)、吲哚-3-乙酸 (IAA)、吲哚丁酸 (IBA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D) 等。

②细胞分裂素 激动素 (KT)、6-苄基嘌呤(6-BA)、玉米素(ZT)、2-异戊烯腺嘌呤(ZIP)等。

③其他 赤霉素(GA<sub>3</sub>)、脱落酸(ABA)、乙烯(ETH)等。

### 6.3.5 有机附加成分

①水解蛋白类：水解酪蛋白、水解乳蛋白等；

②天然复合物：酵母提取物、麦芽等；

③胚乳液：椰子乳汁、玉米胚乳和其他禾本科、乳熟期的胚乳汁等；

④果蔬汁：番茄汁、马铃薯汁、香蕉汁、橘子汁、李子汁、葡萄汁等；

⑤凝胶：常用琼脂，还可用琼脂糖、卡拉胶、吉兰糖胶等。

## 6.4 培养基的配制

### 6.4.1 培养基母液配制和保存

根据培养基配方，分别配制无机营养物、维生素、植物生长调节物质、油及附加成分母液。母液的配制和保存参照 LY/T 1882-2010 的 4.1。如肌醇用量较大，可配制成 10~20 mg/mL 浓度的母液。母液一般在 2~4℃ 保存，保存期应不超过 15 d，植物生长调节物质母液保存期不超过 60 d。

### 6.4.2 培养基配制、灭菌和保存

#### 6.4.2.1 培养基配制

培养基的配制参照 LY/T 1882-2010 的 4.2.1。

#### 6.4.2.2 培养基灭菌

培养基的灭菌按 6.2.2 执行。

#### 6.4.2.3 培养基保存

灭菌后的培养基常温下保存一般不超过 7 d，2~4℃ 条件下保存一般不超过 14 d。

## 7 药用植物细胞培养与保存

### 7.1 外植体的选择与处理

#### 7.1.1 外植体选择

选择的外植体包括：药用植物的根、茎、叶、花、果实、种子等器官，如根的根尖和切段，茎的茎尖、茎节和切段，叶的叶原基、叶片、叶柄、叶鞘和子叶，花的花瓣、雄蕊（花药、花丝）、胚珠、子房等；从胚珠中分离出来的成熟或未成熟胚；或药用植物各部位的组织，如分生组织、形成层、木质部、韧皮部、表皮、皮层、胚乳组织、薄壁组织、髓部等，以及已诱导的愈伤组织；单个游离细胞，如体细胞、花粉细胞、卵细胞等；除去细胞壁的原生质体等。

外植体应在药用植物生长适宜时期，从具有典型性状的健康植株上或已诱导的愈伤组织中等选取。组织培养来源的外植体尽量保存 1 份原植物凭证标本，并注明相关信息。

### 7.1.2 外植体表面灭菌

外植体的表面灭菌按6.2.3执行。

## 7.2 接种

### 7.2.1 操作准备

接种前的操作准备按DB/T 752-2009中9.1执行。

### 7.2.2 接种期间器械消毒

刀、镊、剪等接种器械应先用 70%的乙醇浸泡或擦洗，插入电热灭菌器或用酒精灯灼烤灭菌后，放置 2 min 以上备用。电热灭菌器应在 150~250℃灭菌 30 s 以上，酒精灯灼烤时间应在 10 s 以上。

### 7.2.3 接种

将经过灭菌的外植体置于器皿中，切除其外部边缘，并切成尺寸适中、大小相对均一的小块（通常小于 1 cm），然后平铺或斜插接种到培养基上。接种时接种器械应在接种器皿的斜上方操作，切割后的外植体要和培养基接触良好，深浅适中，分布均匀，芽体应露出培养基。接种后及时封好瓶口以避免染菌。药用植物细胞和原生质体悬浮液直接转移至培养基中。愈伤组织可切成尺寸适中、大小相对均一的小块或直接平铺接种到培养基上。

### 7.2.4 记录

接种后在培养器皿上标明材料名称、培养基类型、接种日期、个人编号等。

## 7.3 药用植物细胞的初代培养

接种后的外植体置于培养室进行培养。根据药用植物特性确定具体药用植物细胞培养的培养温度、光照强度和光周期。通常培养室的相对湿度为 60%，培养温度为 23~28℃。光周期可为光照、黑暗或光照和黑暗交替，光照 12~24 h，黑暗 0~12 h。培养基上有结构松散愈伤组织形成，显微镜下观察为单细胞或较小的细胞团，即为初代培养的细胞。

## 7.4 药用植物细胞的继代培养

经初代培养的细胞需接种到继代培养基上进行继代培养、扩繁。挑选生长旺盛、结构疏松的新鲜愈伤组织作为继代培养的“种子”。继代培养的时间间隔由药用植物细胞的生长速度决定。继代培养包括固体培养、液体培养、悬浮细胞培养、平板培养、饲养层培养和双层滤纸植板等。

## 7.5 药用植物细胞的保存

获得稳定的药用植物细胞后，可对药用植物细胞进行保存。可采用常温培养保存，也可低温固态培养、液态培养、悬浮细胞培养或超低温液氮保存。超低温液氮保存需通过离心等方式将药用植物细胞收

集到冻存管中，放入程序降温盒或程序降温仪中 5~6 h，降至-70℃后立即转移至液氮中长期保存。冻存的药用植物细胞复苏时，需要从液氮中取出冻存管，立即放入 40℃水浴中，轻摇冷冻管使其在快速全部融化，以 70%酒精擦拭冻存管外部，移入无菌操作台内，将细胞悬液移入已加培养基的细胞培养瓶中，放培养箱中培养。