

药用植物细胞培养技术规程

编制说明

提出单位：珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心

归口单位：中华中医药学会

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

主要起草人：黄璐琦、刘汉石、袁媛

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

二〇二一年十二月

目 次

一、工作简况	1
二、主要技术内容	2
三、主要编制过程	2
四、与国内外同类标准的对比和最新标准采用情况	14
五、与现行强制性国家标准或政策法规的关系	14
六、代表性分歧意见的处理经过和依据	14
七、宣传、贯彻标准和后效评价标准的要求和措施	14
八、废止现行有关标准的建议	16
九、相关附录	16

一、工作简况

1. 任务背景

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。利用药用植物细胞培养来生产药用活性成分或补充药物资源已成为稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。2019 年“天山雪莲、人参等药用植物细胞和不定根培养及产业化关键技术”获得国家科技进步二等奖。迄今通过植物细胞工程培养的药用植物细胞已有 400 多种，其中有 60 多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花、洋地黄、天山雪莲等药用植物细胞已实现了工业化生产，以药用植物细胞为原料开发出的保健品、化妆品产值已超过 30 亿。因此，我国药用植物细胞培养具有很大的开发潜力。

药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术。完全采用植物细胞培养技术得到的细胞可能会缺乏生成产物的能力或生产能力不稳定，有时需要选择性诱导环节，以增加活性成分的产量。

目前国内动物细胞体外培养技术成熟，已建立相关的国家标准，如 GB/T 24863-2010 禽畜动物细胞体外培养和保存技术规程。植物组培技术也已制定了相关行业和地方标准，如 LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程、NY/T2306-2013 花卉种苗组培快繁技术规程、DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程等。但药用植物细胞培养相关的技术规程或标准尚处于空白，缺乏规范的培养技术规程，会导致培养过程出现污染、褐变、玻璃化、细胞缺乏生成产物的能力或生产能力不稳定、生产中质控混乱等问题，最终造成人力、物力、财力和时间上的巨大浪费。例如清洗与灭菌、培养基配制等操作不规范易造成污染。培养基组成和配制的差异会造成玻璃化、缺乏生成产物能力等。因此亟需制定一个统一的药用植物细胞培养的标准总则。

本标准的建立和实施，可指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产，提高药用植物细胞培养物的品质，与国际接轨，

有助于促进国际贸易，具有广阔的应用前景。

2. 任务来源

任务来源于国家863计划《药食同源重要功能因子提取、分离及规模化生物合成关键技术研究》(2014AA022201)。

3. 标准起草单位

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。

二、主要技术内容

主要技术内容为药用植物细胞培养过程中的条件和技术方法，包括工作区条件、清洗与灭菌、试剂与培养基、药用植物细胞的培养与保存等。其中，工作区条件包括洗涤间、消毒间、培养基制备间、接种间、培养间、细胞保存间；试剂与培养基包括水、消毒灭菌剂、培养基、培养基配制；药用植物细胞的培养与保存包括外植体的选择及处理、接种、药用植物细胞的初代培养、继代培养和保存，适用于苔藓植物、蕨类植物、种子植物中的药用植物细胞的培养。详见《药用植物细胞培养技术规程》文本部分。

三、主要编制过程

遵循“没有记录，就没有发生”的原则。列出标准制定过程中全部工作步骤及工作内容，召开会议要提供会议纪要。以“成立起草组”为例，如下：

(一) 文献和现有标准、应用情况梳理

2021年1月~2月，标准起草的负责人团队在中国知网学术文献总库(CNKI)、万方数据知识服务平台(Wanfang)、Pubmed等数据库对植物细胞工程、植物组织培养及植物细胞培养的概念、植物细胞工程的应用、植物细胞培养技术的发展和應用、药用植

物细胞培养技术与植物细胞培养技术的差异、存在问题进行了系统的检索和文献梳理，共查找中英文文献相关文献112篇。同时在全国标准信息公共服务平台、标准网等对相关的现有标准进行了检索。最终形成了文献/标准调研报告（附件1《药用植物细胞培养技术规程》文献/标准调研报告）。

1. 植物细胞工程的应用

植物细胞工程技术的应用，催生了一大批先进实用的研究成果和技术，培育了一批优良品种，包括植物细胞工程与植物来源生物产品的生产、植物体细胞无性系变异与植物改良、细胞突变体的筛选、植物干细胞培养、原生质体培养、植物细胞培养或生物反应器生产药用成分、植物快速繁殖技术、体细胞胚胎发生及人工种子、作物育种技术、组织或细胞培养物的超低温保存及种质库的建立。在大力推广常规脱毒和快繁技术的同时，加快发展植物快繁生物反应器和光自养微繁技术，将为种业带来新的变革。生产微型营养器官的人工种子可能成为最先规模化应用的人工种子技术，以体细胞胚为繁殖体的人工种子技术需要进一步研究和完善。应用植物细胞培养技术生产植物来源的生物产品，尽管目前仅在少数植物上实现了商业化生产，但随着植物细胞工程生物反应器技术的完善，其应用领域将进一步扩大。

2. 药用植物细胞培养

药用植物细胞中含有各种特殊的代谢产物、药用成分和各种香精等。其中有些是人工所不能合成的物质；有些是整体植物中含量甚微或整株植物十分缺乏，而培养细胞中的含量却很高，如柠檬叶、鸡眼藤的培养细胞中蒽醌含量比完整植株中高10倍。因此，培养药用植物细胞并生产这些有用成分已受到生物学、医学及商业界人士的极大关注。

近50年来，这一领域的研究取得了飞速的发展。目前已经对400多种药用植物进行了相关研究，从培养细胞中分离到600多种次级代谢产物，其中60多种在含量上超过或等于其原植物，

20 种以上干重超过 1%。紫草、人参、黄连、老鹳草细胞等已达到商品化水平；长春花、毛地黄细胞等已实现工业化生产；牙签草、三分三、红花等 20 多种药用植物细胞正在向商品化过渡。在我国，人参细胞培养技术也已实现产业化；三分三细胞在 80 年代即完成了 10 L 发酵罐中试；紫草、三七等的细胞培养也取得较大的进展。西洋参、云南萝芙木、三尖杉、盾叶薯蓣、九连小檗、薄荷、柴胡、丹参、当归、青蒿、长春花、紫背天葵、延胡索、水仙、粗榧、水飞蓟、罗锅底、重楼等的细胞培养研究也已进行。

3. 现有标准情况

植物细胞工程技术呈现发展规模化、管理规范化和操作自动化的趋势。目前国外一些国家在组织培养实验室、种苗快繁的质量管理、植物来源生物产品的生产和质量管理中已实行良好的实验室规范 (GLP)、生产规范 (GMP)、危害分析和关键控制点 (HACCP) 系统。我国一些植物快繁企业也开展了 GMP 认证。

植物细胞工程技术在产生巨大的社会效益的同时，必然对其技术产品的质量提出更高的要求。目前国内动物细胞体外培养技术成熟，已建立相关的国家标准，如 GB/T 24863-2010 禽畜动物细胞体外培养和保存技术规程。植物组培技术也已制定了相关行业和地方标准，如 LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程、NY/T2306-2013 花卉种苗组培快繁技术规程、DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程等。但药用植物细胞培养相关的技术规程或标准尚处于空白，缺乏规范的培养技术规程，会导致培养过程出现污染、褐变、玻璃化、细胞缺乏生成产物的能力或生产能力不稳定、生产中质控混乱等问题，最终造成人力、物力、财力和时间上的巨大浪费。例如清洗与灭菌、培养基配制等操作不规范易造成污染。培养基组成和配制的差异会造成玻璃化、缺乏生成产物能力等。尤其是药用植物因含有较高含量的次生代谢产物，其细胞培养更易产生褐变、玻璃化等状况，因此亟需制定一个规范的药用植物细胞培养标准通则。

（二）成立标准起草组

1. 标准起草组成立方式

标准起草组由负责人召集相关科研院所、标准使用企业推荐及面向相关企业征集专家等方式召集起草组成员，于2021年2月1日通过召开线上会议和电话沟通的方式成立项目组（详见附件2天山雪莲培养物等2个团体标准起草组成立会议纪要）。

2. 标准起草组组成情况

① 标准起草组组成情况：

标准起草单位由珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心（发改委批准的珍稀濒危药用植物研究机构），中国中医科学院中药资源中心（国家级研究中药的专门机构），大连普瑞康生物技术有限公司（主要药用植物细胞生产企业），广西药用植物园（省级中药的研究机构），安徽中医药大学（省级中药的研究机构），大连源盛泰医疗投资股份有限公司（主要药用植物细胞使用企业）、北京同仁堂健康药业有限公司（主要药用植物细胞使用企业）、浙江中医药大学（省级中药的研究机构），包括中药鉴定、中药生产、中药分析、中医临床应用等不同领域专家共18人，共有高级职称9人，中级职称3人，其他职称6人（附件3《药用植物细胞培养技术规程》起草组成员知情同意书、。

② 标准起草组成员名单及分工：见表1。

表1 标准起草组成员及其工作内容

序号	姓名	单位	职务/职称	专业	学位	工作内容
1	黄璐琦	中国中医科学院	研究员	中药资源和分子生药学	博士	总体设计
2	刘汉石	大连普瑞康生物技术有限公司	高级工程师	经济学	硕士	技术流程管控
3	袁媛	中国中医科学院中药资源中心	研究员	中药资源与鉴定	博士	总体负责、标准起草
4	刘雅萍	珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心	正高级工程师	生物工程	硕士	标准起草
5	秦双双	广西药用植物园	副研究员	中药资源	博士	标准起草及宣讲

6	刘禹	大连普瑞康生物技术有限公司	中级	生物化工	博士	标准起草
7	李晓琳	中国中医科学院中药资源中心	副研究员	中药资源	博士	标准起草及宣讲
8	谢冬梅	安徽中医药大学	教授	中药资源	博士	标准起草及宣讲
9	陈梓	大连普瑞康生物技术有限公司	-	生物工程	硕士	标准起草
10	金银兵	大连普瑞康生物技术有限公司	-	生物化学与分子生物学	硕士	标准起草
11	赵玉洋	中国中医科学院中药资源中心	助理研究员	生物技术	本科	草案修改
12	张显林	大连普瑞康生物技术有限公司	-	食品科学与工程	硕士	标准起草
13	周骏辉	中国中医科学院中药资源中心	助理研究员	生物技术	硕士	草案修改
14	吴俊罡	大连普瑞康生物技术有限公司	-	发酵	硕士	标准起草
15	赵乔	中科院深圳先进技术研究院	-	植物学	博士	草案修改
16	黄利	大连源盛泰医疗投资股份有限公司	-	化学工程与工艺	硕士	草案修改
17	张宏	北京同仁堂健康药业有限公司	正高级工程师	医学	博士	草案修改
18	朱爱松	浙江中医药大学	教授	中医学	博士	草案修改

3. 利益冲突声明

标准起草组包含了科研、生产和医疗等不同领域的专家，不存在利益冲突，可避免标准推荐意见的影响。

（三）标准制定的可行性论证、编制计划制定及项目调研

2021年2月1日在标准起草组的线上会议上，对天山雪莲培养物等2个拟进行起草团体标准的研制背景、标准框架等进行了汇报，与会专家听取了汇报，对《药用植物细胞培养技术规程》团体标准研制的意义、目的、可行性进行了探讨和论证，认为具有编制需求和广泛的应用前景。根据起草组专家意见确定了标准编制工作的整体框架和详细计划，并对标准研制、标准推广等项目内容进行了分工（详见附件1天山雪莲培养物等2个团体标准起草组成立会议纪要）。会后起草组成员对药用植物细胞培养的技术要求包括：工作区条件、清洗与灭菌要求、试剂与培养基、细胞培养、保存标准等进行了调研、整理形成了《药用植物细胞

培养技术规程》项目调研报告（附件 4 《药用植物细胞培养技术规程》团体标准项目调研报告）。

（四）提案、申请、立项

2021 年 2 月 23 日中国中医科学院中药资源中心向中华中医药学会提出立项申请，中华中医药学会标准化委员会开始了立项的三次形式审查，按反馈表的要求，标准编写组逐条认真填写修改意见表，并经过了质询、说明和修改，于 2021 年 4 月 9 日通过了形式审查。2021 年 4 月 13 日-20 日以专家函审的形式进行了立项审查，共 9 位专家无记名投票，赞成、有建议 8 票，赞成票过 3/4 多数，审查专家认为该标准可行性高，拟解决的问题需求巨大，对推动中药产业标准化有重要意义，建议同意立项。此后又通过标准化委员会秘书长会，获准立项。2021 年 6 月 3 日，正式发布立项公告。

（五）标准草案起草

1. 标准的实验研究

外植体选择、愈伤组织诱导、细胞培养是药用植物细胞培养的主要步骤，严格控制组织培养过程中培养基的各营养成分用量，以及激素浓度和配比是保证药用植物细胞大规模生产成功的关键。2021 年 3 月~2021 年 12 月，工作组以天山雪莲、黄芩、红豆杉开展了药用植物细胞培养条件优化的实验研究。上述实验数据为草案的撰写提供了依据。具体的方法及结果如下：

1.1 天山雪莲细胞培养条件的优化

配制植株诱导 MS 培养基和诱导愈伤组织 MS 培养基，选取生长良好的天山雪莲植株作为外植体，接种于诱导愈伤组织 MS 培养基上

1.1.1 天山雪莲细胞诱导方法的比较

分别称取硝酸钾 190 重量份、硝酸铵 165 重量份、硫酸镁 37 重量份、磷酸二氢钾 17 重量份、氯化钙 44 重量份，分别加水 1000 体积份，并加热至完全溶解；将 5 种溶液混合，加水至

5000 体积份，混合均匀，得 MS 培养基母液 A，4℃保存备用；分别称取硫酸锰 6.76 重量份、硫酸锌 3.44 重量份、硼酸 2.48 重量份、碘化钾 0.332 重量份、钼酸钠 0.1 重量份、硫酸铜 0.00005 重量份、氯化钴 0.00005 重量份，分别加水 200 体积份，并加热到完全溶解；将 7 种溶液混合，加水至 2000 体积份，混合均匀，得 MS 培养基母液 B，4℃保存备用；分别称取 EDTANa₂ 7.45 重量份、硫酸亚铁 5.57 重量份，分别加水 1000 体积份，并加热至完全溶解；将 2 种溶液混匀，加热，加水至 2000 体积份，得 MS 培养基母液 C，4℃保存备用；称取甘氨酸 0.4 重量份、盐酸硫胺素 0.08 重量份、盐酸吡哆素 0.1 重量份、烟酸 0.1 重量份和肌醇 20 重量份，加水 1000 体积份，并加热至完全溶解，加水至 1000 体积份，混合均匀，得 MS 培养基母液 D，4℃保存备用；取蔗糖 120 重量份，加水 2000 体积份溶解，加热至沸腾，加入 MS 培养基母液 A100 体积份、MS 培养基母液 B10 体积份、MS 培养基母液 C20 体积份和 MS 培养基母液 D10 体积份，得混合培养基母液；取琼脂 24 重量份，加水 2000 体积份搅拌后，加入上述混合培养基母液中，加热至沸腾，琼脂全部溶化；加水至 4000 体积份；滴加 4%氢氧化钠，调 pH 至 5.8，得植株诱导 MS 培养基；分装；灭菌；备用。

配制 MS 培养基母液，母液比例为 A:B:C:D = 5:2:2:1，4℃保存备用；取 0.15~0.25 g 的 2,4-D，滴加 4 %氢氧化钠至完全溶解，加水至 1000 体积份，摇匀，得 2, 4-D 母液，4℃保存备用；取 0.05~0.15 重量份 6-BA，滴加 4%氢氧化钠至完全溶解，加水至 500 体积份，摇匀，得 6-BA 母液，4℃保存备用；取蔗糖 120 重量份，加水 2000 体积份溶解，加热至沸腾，加入上述 MS 培养基母液 A200 体积份、MS 培养基母液 B20 体积份、MS 培养基母液 C40 体积份、MS 培养基母液 D20 体积份、2,4-D 母液 20 体积份和 6-BA 母液 4 体积份，得混合培养基母液；取琼脂 24 重量份，加水 2000 体积份，搅拌，加入上述混合培养基母液中，加热至沸腾，琼脂全部溶化；加水至 4000 体积份；滴加 4%氢氧化钠，调 pH 至 5.8，得诱导愈伤组织 MS 培养基；分装；灭

菌；备用。

将保藏的天山雪莲种子灭菌，彻底灭菌的天山雪莲种子在无菌条件下接种在配好的植株诱导 MS 培养基上，每 25 ml 培养基中接种 8~15 粒种子；在 25℃，连续光照的条件下培养 10 天，出芽后，培养成天山雪莲植株。1%升汞灭菌 11 min，无菌水清洗 5 次，染菌率最低，出芽率为 100%，灭菌效果最好。

天山雪莲植株继续培养至 5~8 cm，选取生长良好的天山雪莲植株作为外植体；将外植体接种于诱导愈伤组织 MS 培养基上，每 25 ml 培养基中接种 6~10 块直径为 0.5 cm 的外植体，暗培养 5~10 d；诱导产生愈伤组织，愈伤组织在光照条件下培养，光照条件为 8~12 小时/天，温度为 22~28℃。

1.1.2 稳定高产天山雪莲细胞系筛选

通过对天山雪莲愈伤组织的诱导和培养得到了 4 种新疆天山雪莲细胞系：白色系、黄色系、绿色系和紫红色系；对 4 种细胞系分别进行了继代培养，通过对其生长速度、总黄酮含量的检测，确定紫红色细胞系为长势较好，总黄酮化合物含量最高的细胞系。用无菌苗的根、茎、叶以及子叶也均能获得上述紫红色细胞系，优选采用茎作为外植体。

选取紫红色细胞系为原始细胞系，用目测法从固体培养基中挑选颜色较深、色彩鲜亮的紫红色愈伤组织在 MS 中添加 6-BA、NAA、0.6 g/L 琼脂及 30 g/L 蔗糖的固体培养基上继续继代培养。培养条件为 25℃，光照 10~12 小时、2000 Lux。为更好的优化细胞系，继代时接种块大小控制在 3 mm 以下。对所选择细胞系逐步驯化，经过近 100 代筛选获得了可以传代培养的稳定高产天山雪莲细胞系，该细胞系生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、团粒状，质地均一、容易分离；其高效液相指纹图谱与野生天山雪莲基本吻合，且绿原酸的含量高于野生天山雪莲；天山雪莲总黄酮含量为细胞干重的 8~12%。

1.1.3 天山雪莲细胞系的继代培养

比较 3 种继代培养基：① MS 培养基；② B5 培养基；③ N6 培养基。培养基中均添加 0.2~0.5 mg/L 6-BA、2~4 mg/L NAA，

pH 值 5.2~5.8；培养时间 15~20 天。天山雪莲细胞系继代培养时，使用 MS 培养基获得的天山雪莲培养物干重较多，天山雪莲总黄酮含量较高；使用 N6 培养基中获得的天山雪莲培养物中天山雪莲总黄酮含量远高于其它两个培养基，但获得的天山雪莲培养物干重最低。综合上述指标，继代培养中选择 MS 培养基。

1.1.4 液固交替生产方法

1.1.4.1 液体摇床培养制种

① 选种

选取培养 10~14 天，长势较好，颜色鲜艳，呈紫红色，颗粒均匀，质地均一的细胞系作种子细胞。

② 培养基配制

采用 500 ml 培养瓶，每瓶装 120~150 ml 培养液，培养液成分为 MS 中添加 6-BA、NAA 及 30 g/L 蔗糖，pH 值为 5.5；高温灭菌：121℃，20 min。

③ 接种

无菌条件下，将培养物用镊子夹碎后接种到装有 120~150 ml 培养液的 500 ml 培养瓶中，接种量 5% (W/V, g • FW/ml)。

④ 摇床培养

培养条件：培养温度为 25℃，摇床转速 110 rpm，培养时间 9 d，光照 11 h、2000 Lux。培养过程中，发现染菌立即挑出。

1.1.4.2 固体培养

① 液态种子细胞的选取

用显微镜观察检测，选取颜色鲜艳、呈紫红色、长势较好、分散性好、颗粒均匀无污染的培养物作生产用种子细胞。

② 培养基

MS 中添加 6-BA、NAA、0.6 g/L 琼脂及 30 g/L 蔗糖的固体培养基。

③ 接种

无菌条件下，将培养瓶中的培养液滤除，将培养物转移到垫有无菌滤纸的无菌培养皿中，挑取生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，分散性好、颗粒均匀、无污染的细胞团转接至固态培养基上，

接种块大小为 4~6 mm。

④ 固体培养

培养温度：25℃，光照 11 h、2000 Lux；培养周期：15 天。

1.1.4.3 培养物的收集及循环生产

① 留种

大规模生产的同时，可以从中选择生长旺盛、颜色鲜艳、呈紫红色，结构致密、呈团粒状，质地均匀为特征的愈伤组织留种，用于液体摇床培养，选种量以不超过总生产量的 15% 为宜。

② 培养物的收集

收集剩余培养物，低温真空干燥，即可。根据需要，可以将干燥的培养物磨成粗粉或细粉，或者用来提取黄酮及其他活性成分。

1.2 黄芩细胞培养条件的优化

1.2.1 黄芩细胞系培养

将在 MS 固体培养基上稳定继代的愈伤组织，转入到 MS 液体培养基（3% 蔗糖，pH5.8）中进行悬浮培养，光照 16 h/黑暗 8 h 进行培养，以黑暗条件作为对照，摇床转速 120 r/min，培养温度（25±1）℃，接种量约为 2 g/L 鲜重，设 3 个重复。培养液中附加 0.5 mg/L 2,4-D 和 3 mg/L TDZ。

1.2.2 黄芩细胞系有效成分的积累

1.2.2.1 黄芩苷、黄芩素的测定

取黄芩悬浮细胞液 5 mL，4℃、12000 g 离心后，除去上清，沉淀中精密加入甲醇 1 mL，称定质量，超声提取 120 min，取出，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，0.45 μm 滤膜滤过。色谱柱：TC-C18 (4.6 mm x250 mm, 5 μm)。流动相：乙腈-水-甲酸（23:77:10）(A)；乙腈-水-甲酸（80:20:10）(B)；梯度洗脱，梯度洗脱程序为：0-15 min, 100% (A)；15-25 min, 100%-87% (A)；25-40 min, 87%-52% (A)；40-60 min, 52%-0% (A)。检测波长 280 nm；分析时间 60 min；柱温 30℃。

1.2.2.2 光照对黄芩细胞系中黄芩苷含量的影响

在光照条件下，黄芩苷含量在第 20 天含量最高，达到 218.31

$\mu\text{g/g}$ ，随后呈逐渐降低趋势，在第 26 天下降为 $148.95\mu\text{g/g}$ ，降幅达 31.77 %；在黑暗条件下，黄芩苷的变化趋势与光照条件一致，第 20 天为 $183.78\mu\text{g/g}$ ，到第 26 天降为 $96.32\mu\text{g/g}$ ，降幅达 47.59 %。

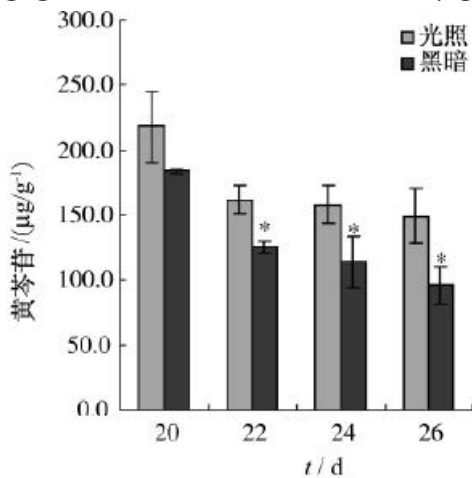


图 1 黄芩悬浮细胞中黄芩苷含量的动态变化 ($P\leq 0.05$)

1.3 红豆杉细胞培养条件的优化

1.3.1 红豆杉细胞培养

取叶及子叶、胚芽作为外植体，在无菌条件下，用无菌手术剪刀和无菌镊子将无菌苗根、茎、叶及子叶、胚芽切成 2~5 mm 长的小段，将外植体接种于培养基上，每 30 ml 培养基中接种 8~10 块直径为 0.5 cm 的外植体，将外植体放于 22℃，暗培养 5~10 d；之后转移至温度为 25℃的培养室培养 10~20 d；最后转移至温度 28℃的培养室培养 10~15 d，获得红豆杉愈伤组织。其中幼嫩叶片和胚芽作为外植体诱导率最高。

1.3.2 高产细胞系筛选

选取生长旺盛、无褐变、黄白色特征的愈伤组织进行周期性的继代培养，愈伤组织的培养条件为：20 g 愈伤组织于 1000 ml 培养基培养，培养周期为 35 d，培养温度为 23℃。选取生长旺盛、无褐变、黄白色特征的愈伤组织作为种子细胞，每培养基中接种 8 块直径为 0.8~1.0 m 的种子细胞进行光培养，光照条件为 3~6 小时/天，培养温度为 22~28℃，培养 30~35 d 后收获。

2. 撰写标准草案

2021年12月，根据项目工作组专家研讨确定的标准范围、调研结果、文献证据和实验数据，项目组起草了《药用植物细胞培养技术规程》草案、编制说明。

草案成稿于2022年12月下旬，完成后进行了组内专家的论证，论证采用通讯形式通过微信将草案发送给组内其他主要成员，除撰写人外的其他起草组主要成员对草案暂无修改意见。

（六）专家征求意见

2022年1月下旬标准起草单位以网络形式，通过电子邮件向北京中医药大学、福建农林大学、南方医科大学、南京中医药大学、江苏大学、甘肃中医药大学、沈阳药科大学、成都中医药大学、中国药科大学、安徽省食品药品检验研究院、广东省药品检验所、国家药典委员会、中国食品药品检定研究院、黑龙江中医药大学等不同领域的非参与单位专家征求意见，共收到30名专家“征求意见稿”，回函并有建议的专家30名。

（七）草案修订

2022年4月-7月，起草组对专家意见进行汇总和研究处理，给出“采纳”、“部分采纳”或“未采纳”的处理意见，汇总形成意见汇总处理表”（详见征求意见稿汇总处理表-药用植物细胞培养技术规程）。经过汇总研究《药用植物细胞培养技术规程》（草案）修改意见后，根据专家意见对《药用植物细胞培养技术规程》（草案）中涉及的名称、术语、定义、工作区条件、清洗与灭菌、培养基配制、细胞培养与保存等进行了规范，修改完善了《药用植物细胞培养技术规程》（草案），最终拟定《药用植物细胞培养技术规程》送审稿，完成定稿工作。

（八）草案送审

2022年7月23日，起草组向中华中医药学会报送了送审材料，包括送审稿、编制说明、征求意见稿汇总处理表、推广方案。

四、与国内外同类标准的对比和最新标准采用情况

(一)描述国内外是否有已发布且正在实施中的同领域标准？本标准与其相比，有什么区别？

目前国内外并无正在实施或已发布的植物细胞培养相关标准。本标准是新制定的药用植物细胞培养的技术规程。在母液的配制和保存、培养基的配置、接种前的操作准备上与 LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程和 DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程有相似之处，参考了上述标准。但药用植物细胞培养和组织培养存在差异，因此在操作规程的其它部分与上述标准存在差异。

(二)是否引用相关标准？引用的内容是什么？

1. GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

引用内容为“实验用水要求”。

2. LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程

引用内容为“母液的配制和保存”及“培养基的配置”。

3. DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程

引用内容为“接种前的操作准备”。

五、与现行强制性国家标准或政策法规的关系

本标准草案与现行强制性国家标准及政策法规无矛盾或冲突。

六、代表性分歧意见的处理经过和依据

项目编制过程中无重大分歧，关于方法细节的分歧可通过会议讨论处理。

七、宣传、贯彻标准和后效评价标准的要求和措施

(一)宣传、贯彻标准的措施

1. 标准的实施单位

本标准发布后，拟在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、浙江中医药大学实施。

2. 其他宣传、贯彻本标准的措施

2.1 标准培训

通过网络的形式或借助学术会议举办每年至少一次全国范围的标准培训班，面向全国植物细胞培养物生产企业、原料使用企业、销售企业、科研院所的相关人员宣传、推广《药用植物细胞培养技术规程》这一团体标准，指导如何运用标准生产、质控和开展科学研究等。此外，通过邮件、电话、微信等形式指导标准应用，并对标准应用过程中的问题进行咨询和解答。

2.2 标准应用

面向全国植物细胞培养物生产企业、原料使用企业、销售企业、科研院所推广《药用植物细胞培养技术规程》这一团体标准，指导标准应用，并对标准应用过程中的问题进行咨询和解答。

2.3 媒体宣传

通过网页、微信公众号、中药相关的网络平台等进行标准的宣传和推广；通过在学术会议做相关报告、发放宣传资料来进行标准的宣传和推广。

（二）标准的用户评价

拟于标准实施2年后，通过发放调查问卷的模式开展标准的用户评价，评价内容包括：

- （1）该标准的应用情况，应用规模；
- （2）该标准的适用性，是否适用于贵单位的产品或技术服务；
- （3）实施标准的过程中，是否遇到问题；

(4) 对标准的建议和意见。

(三) 标准的修订

拟于标准实施3年后根据执行情况开展标准的更新或修订工作。

八、废止现行有关标准的建议

无。

九、相关附录

附件 1 《药用植物细胞培养技术规程》文献/标准调研报告

附件 2 《天山雪莲培养物》等 2 个团体标准起草组成立会议纪要

附件 3 《药用植物细胞培养技术规程》起草人知情同意书

附件 4 《药用植物细胞培养技术规程》团体标准项目调研报告

附件 1

《药用植物细胞培养技术规程》文献 /标准调研报告

目录

1 植物细胞工程、植物组织培养及植物细胞培养	1
1.1 植物细胞工程	1
1.2 植物组织培养	1
1.2.1 植物组织培养概述	1
1.2.2 植物组织培养技术原理	1
1.3 植物细胞培养	2
1.4 植物细胞工程的应用	2
1.4.1 原生质体培养	2
1.4.2 植物细胞培养或生物反应器生产药用成分	3
1.4.3 植物快速繁殖技术	4
1.4.4 体细胞胚胎发生及人工种子	4
1.4.5 作物育种技术	5
1.4.6 组织或细胞培养物的超低温保存及种质库的建立	7
2 植物细胞培养	8
2.1 植物细胞培养技术的发展	8
2.1.1 基础理论发展阶段	8
2.1.2 基本技术发展阶段	9
2.1.3 应用研究发展阶段	9
2.2 植物细胞培养技术的应用	9
2.2.1 植物细胞工程与植物来源生物产品的生产	9
2.2.2 植物体细胞无性系变异与植物改良	10
2.2.3 细胞突变体的筛选	11
2.2.4 植物干细胞培养	11
2.3 药用植物细胞培养技术	12
2.3.1 药用植物细胞培养	12
2.3.2 药用植物细胞培养与植物细胞细胞培养的比较	13
2.3.3 存在问题及展望	14

1 植物细胞工程、植物组织培养及植物细胞培养

1.1 植物细胞工程

细胞工程是应用细胞生物学、遗传学和分子生物学的理论和方法，从细胞水平上对细胞进行大规模培养和分子水平上的基因改造^[1]。根据研究材料的不同，可分为植物细胞工程和动物细胞工程。植物细胞工程是以植物细胞全能性为理论基础，以植物组织与细胞培养为技术支持，在细胞和亚细胞水平对植物进行遗传操作，实现植物改良和利用，或获得植物来源的生物产品的科学技术^[2]。植物细胞工程的基本技术包括组织培养技术和体细胞杂交技术。

1.2 植物组织培养

1.2.1 植物组织培养概述

植物组织培养即植物的离体培养，是指在无菌和人工控制的环境条件下，利用适当的培养基，对离体的植物器官、组织、细胞及原生质体进行培养，使其生成完整植株的技术。植物组织培养广义上是指对植物的植株、器官、组织以及原生质体进行培养的技术；狭义上是指对植物的组织及培养产生的愈伤组织进行培养的技术^[3]。植物组织培养是植物生物技术的重要组成部分和基础研究手段，已渗透到生物学科各个领域，在植物的快繁、脱毒、植物育种、种质资源的保存和次生代谢物的生产等领域发挥着巨大的作用，产生了巨大的经济效益和社会效益，是现代生物学科中最有生命力的学科之一。

1.2.2 植物组织培养技术原理

植物组织培养的原理是细胞全能性。细胞全能性是指高度分化的植物体细胞具有全能性，细胞经分裂和分化后，均具有同样的或基本相同的成套的遗传物质，只不过在特定条件下才会表达，如一定营养的物质、激素和其他适宜条件^[4]。组织培养基于此原理诱导形成愈伤组织，在伤口表面新生的组织，再在愈伤组织上形成新的丛生芽。

1.3 植物细胞培养

植物细胞培养是应用生物工程研究成果，在细胞水平上生产植物生物制品的技术。植物细胞培养是指在离体条件下，将愈伤组织或其它易分离的组织置于液体培养基或固体培养基中进行培养，得到分散成游离的悬浮细胞或细胞群，通过继代培养使细胞增殖，从而获得大量的细胞群体的一种技术^[3]。早在 20 世纪 50 年代人们就发现离体培养的高等植物细胞具有合成并积累次生代谢产物的潜力。在当前植物资源短缺和需求不断加大的形势下，靠提取分离途径已很难满足市场需求，利用植物细胞培养技术生产植物产品已成为工业化生产植物产品的一条有效途径。这些产品既可用作药物生产的原料，也可作为工业、农业、食品添加剂等的原料。自紫草细胞培养提取出紫草宁成为第一个植物细胞培养技术商品至今，国内外动、植物细胞大规模培养研究很快遍布各个医药领域。运用工程细胞培养生产有价值的新型药物和分离有效成分的技术越来越得到了医药界广泛关注和认可。该技术尤其适合于资源短缺、采集困难、种植要求高的名贵药材。运用植物细胞培养技术研制与开发现代天然产物是当今国际细胞培养技术产业化的热点问题和主要发展方向之一，也是我国实现中药现代化，开创低成本、高产出、无污染的工业化生产天然植物药的新思路。

1.4 植物细胞工程的应用

植物细胞工程技术的应用，催生了一大批先进实用的研究成果和技术，培育了一批优良品种。在大力推广常规脱毒和快繁技术的同时，加快发展植物快繁生物反应器和光自养微繁技术，将为种业带来新的变革。生产微型营养器官的人工种子可能成为最先规模化应用的人工种子技术，以体细胞胚为繁殖体的人工种子技术需要进一步研究和完善。应用植物细胞培养技术生产植物来源的生物产品，尽管目前仅在少数植物上实现了商业化生产，但随着植物细胞工程生物反应器技术的完善，其应用领域将进一步扩大。

1.4.1 原生质体培养

原生质体培养和体细胞杂交是植物细胞工程的核心技术之一，为克服植物远

缘杂交不亲和性，创造新的种质资源，实现植物遗传转化和进行细胞学的基础研究提供了重要的技术支撑。自 1971 年 Takebe 等首次报道获得烟草叶肉原生质体再生植株以来，原生质体培养和体细胞杂交技术一直是植物细胞工程的重要研究领域，在分离原生质体的材料选择、培养基与培养环境控制、体细胞杂交技术等方面进行了大量研究，建立了原生质体培养和体细胞杂交的技术程序。到 1976 年，有 12 种植物的原生质体能再生植株，1983 年增加到 70 种，1986 年超过 80 种，到 90 年代初期达到 100 种以上。原生质体培养是 80 年代的一个研究热点。日本和中国在这一领域做出了很大的贡献。日本科学家成功地进行了大约 70 个植物品种的原生质体培养。我国获得了 30 个以上品种的原生质体再生植株，其中包括难度较大的重要粮食作物和经济作物大豆、水稻、玉米、小麦、谷子、高粱、大麦、棉花、油菜、马铃薯等^[5]。在木本植物、药用植物、蔬菜和真菌原生质体培养方面的进展也十分迅速。

1.4.2 植物细胞培养或生物反应器生产药用成分

植物细胞培养是指利用植物细胞，以现代生物工程技术手段来进行大规模工业生产，来获得人类所需产品的技术。1956 年 Routier 与 Nickell 首次提出以植物细胞培养物来合成药物，而后在 1967 年 Kaul 与 Staba 采用了多升发酵罐对牙签草进行了大规模细胞和组织培养的研究，并通过培养得到了呋喃色酮^[6]。植物细胞生物反应器由于技术、工艺和成本等原因，目前仅有少数产品(人参皂苷、紫草宁、紫红素、紫杉醇等)在韩国、日本、德国等国家实现了商业化应用。随着技术的进一步完善和生产成本的降低，该技术在植物来源生物产品的生产方面将有广阔的发展前景。

植物生物反应器是指通过植物细胞悬浮培养技术，培养的天然的或转基因的植物细胞，组织或整个植株作为“工厂”来大量生产人类所需产品。在我国植物生物反应器的研究于 20 世纪 90 年代初期开始，目前在培育转基因植物和构建高效植物表达载体等主要技术方面与国外技术相差很小，但是对于植物生物反应器研究与应用的积累上与国外发达国家还存在较大差距，在国家通过“九五”计划对植物生物反应器进行政策扶持后，目前已经取得的成果有：①使马铃薯与番茄导入乙型肝炎病毒包膜蛋白的基因，并获得高效表达的外源基因植株。②使马铃薯导

入产毒素大肠杆菌热敏毒素 b 亚基及定居因子 CS6B 抗原蛋白基因，并获得高效表达重组抗原蛋白的马铃薯植株。③得到了口蹄疫流行株的基因文库并得到了 O 型口蹄疫口服疫苗 VP1 基因，可作为疫苗研究进行转基因表达蛋白^[7]。

1.4.3 植物快速繁殖技术

60 年代，法国的 Morel 用茎尖培养的方法大量繁殖兰花获得成功。植物快速繁殖技术、试管苗工厂化生产和无病毒种苗生产技术在 70 年代得到了快速的发展。通过离体培养获得小植株并且具有快速繁殖潜力的植物已有 100 多科、1000 种以上，有的已经发展成为工业化生产的商品。植物快繁技术包括用于快速繁殖优良品种、濒危物种及转基因植物的组织培养技术以及通过切取茎尖进行组织培养，从而获得脱毒苗的作物脱毒技术。种类也由以观赏植物为主逐渐发展到果树、林木、蔬菜和大田作物。美国、法国、意大利、荷兰等欧美国家试管苗的年产量均在数千万株以上，并且以每年 7%-8% 的速度增加。

我国快速繁殖和无病毒种苗生产的研究始于 70 年代。“六五”期间主要是研究、积累阶段，到“七五”期间研究成果开始向应用转化并大见成效。马铃薯无毒种薯和甘蔗种苗已在生产上大面积种植。兰花、香石竹、月季、菊花、唐菖蒲、百合、花烛、非洲菊、蒲包花、大花萱草、非洲紫罗兰、大岩桐、重瓣玉簪、花叶芋、瑞香、橡皮树、草莓、茶花、桉树、杨树、苹果、柑桔、枣树、枸杞、醋栗、葡萄、木薯、无籽西瓜已进行规模化生产或中间试验。试管苗的年产量已由 90 年代初期的 2000 万株左右发展到现在的 5000 万到 1 亿株以上。此外，一些作物脱毒技术也不断被开发出来，如微型脱毒马铃薯生产技术、马铃薯脱毒小薯的喷雾无基质栽培技术等。

1.4.4 体细胞胚胎发生及人工种子

据不完全统计，能大量产生胚状体的植物已有 43 科、92 属、100 多种。一些重要作物如水稻、小麦、玉米、珍珠谷等，也能通过离体培养产生胚状体。1977 年，Murashige 第一次提出利用植物组织培养中体细胞胚胎发生的特点，把胚状体包埋在胶囊内形成球状结构，使其具有种子的机能并可直接播种于田间的设想。人工种子是以植物组织培养得到的胚状体、不定芽、顶芽和腋芽等为材料，

经过人工薄膜包装得到的种子。80年代初，美、日、法等国相继开展了人工种子的研究，并且在胡萝卜、苜蓿、芹菜、花椰菜、莴苣、花旗松等植物上获得了初步的成功。欧洲将人工种子研究纳入“尤里卡计划”。印度、芬兰、瑞士、韩国等国也开展了研究。我国人工种子的研究开始于“七五”期间，并且被列入了“863高技术研究发展计划”。对胡萝卜、芹菜、黄连、苜蓿、西洋参、云杉、华腺萼木、四会贡桃、番木瓜、芫荽等十几种材料进行了系统的研究。目前这一领域存在的最主要的问题是模拟人工种皮。相信随着人工种皮制作和其它一些问题的突破，人工种子总有一天会实现工业化生产，给农业生产带来根本性的变革。

1.4.5 作物育种技术

应用于作物育种的植物细胞工程技术包括细胞融合与体细胞杂交、胚胎培养、单倍体育种、体细胞无性系变异、细胞突变体的筛选等。

(1)细胞融合与体细胞杂交

第一棵体细胞杂种植株是在1972年建立的，美国的 Carlson 诱导粉蓝烟草和郎氏烟草的原生质体融合并获得了杂种植株。早期的研究对象主要集中在茄科的烟草属、曼陀罗属和矮牵牛属，以后逐渐转移到茄属、番茄属、颠茄属和十字花科的芸苔属、拟南芥属和伞形科的胡萝卜属、欧芹属。随着重要粮油作物的原生质体再生植株的成功，研究对象又再一次转移。用于融合的亲本细胞也由最初的品种间进展到种间、属间甚至科间。

亚太地区大约诱导了50多个种间和属间的原生质体融合形成植株，其中日本占一半。通过木本植物柑桔类种属间的体细胞杂交，培育出新的柑桔杂交品种，有性杂交不亲和的番茄+马铃薯间的体细胞杂交也获得了杂种植株。通过马铃薯的栽培品种与野生种的体细胞杂交，得到了抗晚疫病和卷叶病的体细胞杂种。白菜型油菜与甘蓝的体细胞杂交，得到了甘蓝型油菜。科间的大豆+粉蓝烟草、大豆+烟草也产生了连续增殖的杂种细胞系，更远缘的大豆+水稻产生了愈伤组织。日本科学家还利用不对称细胞融合技术培育获得世界上第一个商品烟草雄性不育系，应用这种雄性不育系，又开发了胡萝卜、卷心菜和茄子的F1代杂种。我国科学家利用烟草与黄花烟草和粉蓝烟草的体细胞杂交开发出新的烟草商品品种。

(2)胚胎培养

植物胚胎培养是胚、胚珠、子房和胚乳的离体培养技术，其应用领域包括胚胎的发育机理、克服杂交不亲合性和胚拯救、克服珠心胚的干扰、打破种子休眠，缩短育种周期，获得体细胞胚和人工种子，建立植物高效再生体系等，并在农作物、园艺作物、林木和药用植物上广泛应用。胚乳培养的主要目的是获得具有利用价值的三倍体植株，还可作为研究淀粉等营养物质合成和代谢的实验体系。植物离体受精技术是植物细胞工程中的重要实验技术，为研究植物胚胎发育机理提供了新的实验系统，为开发新的植物转基因途径提供了可能。目前，已经有 100 篇以上幼胚培养成为植株的报道，有 40 多个杂种胚培养成功。印度科学家在栽培种菜豆、黄麻和花生的远缘杂交中获得了理想的重组体。日本科学家获得了 3 个柑桔属、李属和芸苔属品种和 5 个百合栽培种。中国农科院蔬菜所培养结球甘蓝和大白菜的杂种胚得到了种间杂种。中科院植物所和北京市农科院合作育成早熟桃新品种“京早 3 号”，成熟期比一般早熟桃提前 15-20 天。西北植物所得到了节节草和普通小麦的属间杂种。中国农科院棉花所获得了栽培棉和野生棉的种间杂种。大麦+小麦、大麦+提莫菲维小麦、小麦+冰草(育成新品种小堰 6 号)、小麦+大赖草、小麦+簇毛麦、小麦+黑麦、硬粒小麦+簇毛麦等也通过胚培养获得了杂种。烟草属间杂种、水稻品种间杂种也已经得到。

(3)单倍体育种

加倍单倍体技术(Doublehaploid Technology)是指利用植物组织培养技术培养单倍体植物材料(花药、花粉、未受精的子房和胚珠)获得单倍体植物，然后通过自然或人工加倍的方法获得双倍体植株的技术。其中以花药和花粉培养应用最为广泛。利用加倍单倍体技术进行花药和花粉培养，已在 250 多种植物上获得成功，中国、加拿大、澳大利亚、欧盟等在花卉育种中取得了突出的研究成果。

我国于 1970 年开始这方面的研究，并在 70 年代成为一个热点，也取得了很大的成果。培育 40 种以上植物的花粉或花药发育成单倍体植株，其中小麦、黑麦、小冰麦、玉米、橡胶树、杨树、辣椒、甜菜、白菜、油菜、柑桔、甘蔗、大豆、葡萄和苹果等的单倍体植株为我国首创。通过单倍体育种获得了水稻、小麦、烟草、辣椒和甜椒新品种，如单育 1 号、2 号、3 号烟草新品种，京花 1 号、2 号等 6 个小麦新品种，中花 8 号、9 号等 15 个水稻新品种，总种植面积达 1000 万亩。玉米获得了 100 多个纯合的自交系，橡胶获得了二倍体和三倍体植株。

(4)体细胞无性系变异

80 年代以来，体细胞无性系变异成为继花粉和花药培养之后的又一种实用化的细胞工程育种新方法。体细胞无性系变异是植物组织培养过程中出现的普遍现象，并且绝大多数变异可以遗传，在再生植株中能够找到在常规诱变育种和杂交育种中所观察到的各种变异或重组类型。已经观察到体细胞无性系变异的农作物有甘蔗、马铃薯、菠萝、水稻、小麦、玉米、燕麦、大麦、小黑麦、谷子、油菜、大豆、兰花、番茄、茄子、瓜类、甜菜、芹菜、烟草、草莓、桃、天竺葵、倒挂金钟、香石竹、水晶掌和锦带花等。

澳大利亚科学家是体细胞无性系变异研究领域的先驱。他们的研究证明了这种方法在小麦、甘蔗和其它作物改良中的有效性。通过培养期间施加选择压力已经筛选获得体细胞无性系变异体及其品系，现已作为品种推广。日本获得了百合、西瓜、大丁草、草莓和兰属的新品种及抗病性水稻、番茄和烟草品系。泰国获得了改良型香蕉和菊花新品种。印度从芥菜和芸苔属中诱导出早熟性、株高、成熟度都较好的变异体。我国近年来在稻麦体细胞无性系变异育种方面也取得了令人鼓舞的进展。已经培育出抗白叶枯病及赖氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、丝氨酸和酪氨酸含量高于亲本系的水稻变异体。培育的抗盐水稻在 1992 年就已种植 3 万亩。还选育出一批蛋白质含量高和白粒的小麦新品系。

1.4.6 组织或细胞培养物的超低温保存及种质库的建立

为植物的种质资源的长期保存开辟了一条新途径。许多植物的组织或细胞培养物在液氮中超低温保存以后，仍然能保持很高的存活率，并且能再生出新植株和保持原来的遗传特性。如胡萝卜和烟草的悬浮细胞超低温保存 6 个月以后仍然能恢复生长并分化出植株。将植物细胞工程技术与超低温保存种质法结合起来，可以实现植物种质资源的长时间保存于利用。超低温保存的材料，可以是愈伤组织和悬浮细胞、原生质体和花粉，也可以是胚状体、幼胚、芽和茎尖分生组织等。

植物细胞工程技术体系是植物组织培养技术的集成和优化。培养和选育高效型的优良细胞株系，建立植物高频率再生体系，优化突变体筛选、无糖培养和快繁技术，开发适合规模生产的低成本培养基，优化植物细胞生物反应器的设计和工艺，加强计算机技术和自动化控制技术在植物细胞工程中的应用，形成一套集

成创新的技术体系，将推植物细胞工程技术向高效、可控和多样化的方向发展。

1.5 植物细胞工程相关标准

植物细胞工程技术呈现发展规模化、管理规范化和操作自动化的趋势。目前国外一些国家在组织培养实验室、种苗快繁的质量管理以及植物来源生物产品的生产和质量管理中实行良好实验室规范(GLP)、良好生产规范(GMP)和危害分析和关键控制点(HACCP)系统。我国一些植物快繁企业也开展了 GMP 论证。植物细胞工程技术在产生巨大的社会效益的同时，必然对其技术产品的质量提出更高的要求。

目前国内动物细胞体外培养技术成熟，已建立相关的国家标准，如 GB/T 24863-2010 禽畜动物细胞体外培养和保存技术规程。植物组培技术也已制定了相关行业和地方标准，如 LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程、NY/T2306-2013 花卉种苗组培快繁技术规程、DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程等。但药用植物细胞培养相关的技术规程或标准尚处于空白。缺乏规范的培养技术规程，会导致培养过程出现污染、褐变、玻璃化、细胞缺乏生成产物的能力或生产能力不稳定、生产中质控混乱等问题，最终造成人力、物力、财力和时间上的巨大浪费。例如清洗与灭菌、培养基配制等操作不规范易造成污染。培养基组成和配制的差异会造成玻璃化、缺乏生成产物能力等。因此亟需制定一个统一的药用植物细胞培养的标准总则。

2 植物细胞培养

2.1 植物细胞培养技术的发展

植物细胞培养的概念是 20 世纪初期提出来的，100 年来，共经历了三个阶段、即基础研究阶段、技术储备阶段和高速发展阶段。

2.1.1 基础理论发展阶段

19 世纪 30 年代，施旺和施莱登创立了细胞学说，认为细胞是生物体的基本构成单位。

1920 年 Hanberlandt 提出了植物细胞全能性概念，认为植物细胞具有再生成完整植株的潜在全能性。

1934 年，温特发现了第一种植物生长素——吲哚乙酸，生长素是一类能促进细胞生长的含苯环的化合物。

1954 年，缪尔首次进行了植物细胞的悬浮培养。1958 年斯特瓦德从胡萝卜皮部诱导得到愈伤组织，再分离得到单细胞，经分化培养形成再生植株。

2.1.2 基本技术发展阶段

1962 年，穆拉辛格与斯库格设计了 MS 培养基，主要特点是无机盐浓度高，属较稳定的离子平衡溶液，其营养成分的种类和比例适宜。直至 1974 年，连续设计出了 B5、NT、KM-8P 等培养基。

2.1.3 应用研究发展阶段

植物细胞培养可用于生产次级代谢产物，具有提高产率、缩短周期、提高产品质量等特点，且不占用耕地，不受地理环境和气候条件的影响，还可以结合基因转移、原生质体融合等技术获得优良特性的植物新品种。1970 年，Power 首次成功实现原生质体融合。在世界上的不少国家和地区，它已从实验室的研究手段一跃而成为大规模成批量的种工厂化生产方法，性繁殖系的快速繁殖的生产，试管品种的高品化，是日前植物组织和细胞培养技术在应用上的主流之一。在 21 世纪，随着科技的发展，植物细胞培养及其应用技术将进一步发展到前所未有的水平，并取得巨大的经济效益和社会效益，为人类的健康长寿和社会经济的发展做出更大的贡献。

2.2 植物细胞培养技术的应用

2.2.1 植物细胞工程与植物来源生物产品的生产

利用植物细胞工程技术生产植物来源的生物产品，是植物细胞工程的一个重要领域，应用范围包括生产天然药物(人参皂苷、地高辛、紫杉醇、长春碱、紫

草宁等)、食品添加剂(花青素、胡萝卜素、甜菊苷等)、生物农药(鱼藤碱、印楝素、除虫菊酯等)和酶制剂(SOD 酶、木瓜蛋白酶)等。利用细胞悬浮培养、固定化细胞培养和毛状根培养技术设计生物反应器,可以实现植物来源生物产品的规模化生产。建立在植物细胞培养技术基础上的植物来源生物产品的生产,经过多年的研究与开发,已发展成为比较成熟的技术,其技术体系包括筛选高产细胞系、选用合适的培养基(基本培养基、生长调节物质、饲喂前体、诱导子等)、优化培养环境、发展固定化培养技术、改进产品的分离和提取技术。

目前用于以次生代谢产物生产为目的的组织培养和细胞培养的药用植物已有多。从细胞培养物中分离得到的有用物质有:酶类(α -淀粉酶、淀粉酶、蛋白水解酶、过氧化氢酶、酸性磷酸化酶、 β -糖苷酶、I-AA 氧化酶、细胞色素氧化酶等);生物碱(莨菪生物碱、利血平、吲哚生物碱、麦角碱等);甾体(地奥甾元、山萮皂甾元、育亨皂甾元等);萜类(角鲨烯、羊毛甾醇、环阿屯醇、人参三醇、人参二醇、油烷酸、人参甾等);色素等。目前我国学者已经建立了长春花、人参、丹参、三七、三尖杉、忍冬、红花、黄连、西洋参等几十种药用植物的液体培养系统,并实现了人参的 10 L 体积的大规模培养。

2.2.2 植物体细胞无性系变异与植物改良

体细胞无性系变异(somaclonal variation)是植物体细胞在植物组织培养过程中产生的变异。利用体细胞无性系技术可以选育植物优良的品种(品系),获得育种的中间材料或作为复合育种的一个中间环节。还可以利用突变体材料做遗传分析和生理生化等基础研究。已经观察到体细胞无性系变异的农作物有甘蔗、马铃薯、菠萝、水稻、小麦、玉米、燕麦、大麦、小黑麦、谷子、油菜、大豆、兰花、番茄、茄子、瓜类、甜菜、芹菜、烟草、草莓、桃、天竺葵、倒挂金钟、香石竹、水晶掌和锦带花等。

澳大利亚科学家是体细胞无性系变异研究领域的先驱。他们的研究证明了这种方法在小麦、甘蔗和其它作物改良中的有效性。通过培养期间施加选择压力已经筛选获得体细胞无性系变异体及其品系,现已作为品种推广。日本获得了百合、西瓜、大丁草、草莓和兰属的新品种及抗病性水稻、番茄和烟草品系。泰国获得了改良型香蕉和菊花新品种。印度从芥菜和芸苔属中诱导出早熟性、株高、成熟

度都较好的变异体。我国近年来在稻麦体细胞无性系变异育种方面也取得了令人鼓舞的进展。已经培育出抗白叶枯病及赖氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、丝氨酸和酪氨酸含量高于亲本系的水稻变异体。培育的抗盐水稻在 1992 年就已种植 3 万亩。还选育出一批蛋白质含量高和白粒的小麦新品系。

2.2.3 细胞突变体的筛选

细胞突变体的筛选最早始于 1959 年, G. Melchers 在金鱼草悬浮细胞培养中获得了温度突变体。1970 年, P. S. Carlson、H. Binding 和 Y. M. Heimer 等人分别分离出烟草营养缺陷型细胞、矮牵牛抗链霉素细胞系及烟草抗苏氨酸细胞系。迄今为止, 已经在不少于 15 个科、45 个种的植物细胞培养中筛选出 100 个以上的细胞突变体或变异体, 其中包括水稻、小麦、玉米、高粱、大麦、燕麦、甘蔗、大豆、亚麻、番茄、马铃薯、胡萝卜、苜蓿、烟草、向日葵等重要经济作物。筛选出的突变体有抗病细胞突变体、抗氨基酸及其类似物细胞突变体、逆境胁迫抗性突变体、抗除草剂细胞突变体及营养缺陷型细胞突变体等。

2.2.4 植物干细胞培养

植物干细胞就是未分化的细胞, 也叫分生组织。植物干细胞在内外环境的影响下, 可通过自身调控信号来调控生长、衰老、成熟等过程, 也是生长发育的根源, 也有自我持续分裂和自我更新的能力, 具有能有分化地上、地下器官的作用能力。植物干细胞处于凋零状态时, 可以通过自我凋亡的能力阻止外界恶劣环境, 防止遗传性损伤, 避免不好的组织遗传。药用植物干细胞培养可以用来生产天然产物。例如人参干细胞的培养会有细胞产物产生, 这些成分都可用于化妆品、药品、食品等行业当中。人参干细胞产物具有的功效包括: (1)治疗综合征, 如免疫缺陷方面; (2)预防、治疗肝疾病, 有效阻止肝炎病毒的再次繁殖, 加强其抗体的作用; (3)治疗淋巴, 增强其免疫力能力, 预防繁殖; (4)可以治疗癌细胞, 防止肿瘤的再次形成、生长; (5)预防衰老等病症, 抑制由 UV 辐射引起的活性氧^[8]。

对于形成层的干细胞系来说, 在温度较低的环境中保存占绝对的优势, 存活率高, 并且生长速度较快, 稳定性极强。干细胞系库的构建, 可以防止植物培养细胞过程发生变异等现象, 造成损失, 在植物种质资源保存中起到重要作用。

2.3 药用植物细胞培养技术

2.3.1 药用植物细胞培养

通过细胞培养技术发现培养细胞中含有各种特殊的代谢产物、药用成分和各种香精等。其中有些是微生物；有些是人工所不能合成的物质；有些是整体植物中含量甚微或整株植物十分缺乏，而培养细胞中的含量却很高，如柠檬叶、鸡眼藤的培养细胞中蒽醌含量比完整植株中高 10 倍。因此，以培养细胞生产这些有用成分已受到生物学、医学及商业界人士的极大关注。近 50 年来，这一领域的研究取得了飞速的发展。已经对 400 多种植物进行过研究，从培养细胞中分离到 600 多种次级代谢产物，其中 60 多种在含量上超过或等于其原植物，20 种以上干重超过 1%。紫草、人参、黄连、老鹳草等已达到商品化水平；长春花、毛地黄、烟草等已实现工业化生产；牙签草、三分三、红花等 20 多种植物正在向商品化过渡。在我国，人参细胞培养技术也已实现产业化；三分三在 80 年代即完成了 10L 发酵罐中试；紫草、三七等的细胞培养也取得较大的进展。西洋参、云南萝芙木、三尖杉、盾叶薯蓣、九连小檗、薄荷、柴胡、丹参、当归、青蒿、长春花、紫背天葵、延胡索、水仙、粗榧、水飞蓟、罗锅底、重楼等的细胞培养研究也已进行。

(1)植物细胞培养生产抗癌药物紫杉醇

紫杉醇 (taxol) 是一种用于卵巢癌、乳腺癌、肺癌的高效、低毒、广谱，并且作用机制独特的抗癌药物，被誉为 20 世纪 90 年代国际上抗肿瘤药三大成就之一。但自 1993 年紫杉醇上市以来，紫杉醇的来源问题成为世界性的研究热点。日本曾从短叶红豆杉 *Taxusbrevifolia Nutt.* 和东北红豆杉 *T. cuspidata Sieb. et Zucc.* 中进行愈伤组织的诱导、筛选得到的细胞株，可在 4 周培养时间内细胞增殖 5 倍，同时紫杉醇含量达到 0.05%，比原来的红豆杉树皮紫杉醇含量增加了 10 倍。悬浮培养细胞的紫杉醇含量大于 20 mg/L^[9]。

(2)细胞培养生产人参皂苷

1964 年，中国科学院上海植物生理研究所首先成功地进行了人参的细胞培养，随后我国和其他国家的一些学者将人参的细胞培养过渡到工业化生产。随后，日本、前苏联、联邦德国、美国等国家的研究人员也先后发表了关于人参组织培

养的研究报告。日本于 1986 年开始有 13 L 规模的培养罐，并悬浮培养人参细胞并从中提取人参皂苷 (ginsenosides)^[10]。

(3)毛地黄细胞培养

德国用 1000L 发酵罐培养毛地黄细胞;利用培养细胞的生物转化能力生产高值化合物，德国科学家进行了出色的研究。他们在毛地黄细胞的培养中加入生物合成途径的中间化合物毛地黄毒素和 β -甲基毛地黄毒素，培养细胞以几乎 100% 的转化速率使之羟基化，变为医药强心剂地高辛。这一技术已实现工业化生产。

2.3.2 药用植物细胞培养与植物细胞细胞培养的比较

由于植物细胞所固有的特点，致使常规植物细胞培养技术用于工业生产存在着以下问题。(1)细胞增殖速度慢：植物细胞一般比细菌大 10 万倍以上，因此在液体培养时，细胞的加倍时间比细菌和真菌长得多。发酵时间需要 2 周至 2 个月，而细菌和真菌仅需数小时至一周；(2)细胞的分散度：由于植物细胞的分裂方式使得细胞间的内壁相互交叉往往使细胞结合在一起形成聚集体，从而影响细胞的生长；(3)细胞缺乏生成产物的能力和生产能力的不稳定性，许多有价值的药用物质，离体培养细胞不能合成，尽管细胞具有合成这些物质的遗传能力；或者，新建立的细胞系即使能生产这些化合物，但随着传移培养，往往活力丢失，提示催化生物合成的酶系，其遗传信息的基因处于抑制状态而停止表达；(4)细胞内化合物的积累：植物细胞所形成的次生代谢产物，大多于细胞内液泡中积累，不易排入培养基中，由此势必造成提取过程困难和生产过程不经济^[11]。

药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术。完全采用植物细胞培养技术得到的细胞可能会缺乏生成产物的能力或生产能力不稳定，有时需要选择性诱导环节，以增加活性成分的产量。

在培养细胞中如加入适当的因子引起胁迫条件，促使植物细胞处于应激状态，从而诱导所期望的化合物形成或增加其产量。这种胁迫诱导作用包括生物胁迫诱导和非生物胁迫诱导（化学诱导、物理诱导等）。例如粗榧生物碱的诱导。粗榧 (*phalotaxus harringtonia*) 在愈伤组织或悬浮培养细胞一开始就能产生少量的三尖杉碱 (Cephalotaxine) 和抗肿瘤有效成分高三尖杉酯碱(Homoharringtonine)。然而这种合成能力，在随后的转移中很快便丧失。但在粗榧细胞悬浮培养液中，

加入热变性的大丽花轮枝孢(*Verticillium dehliae*), 这是一种能引起多种植物致枯萎病的真菌, 在培养 6-8 天后, 生物碱及其酯化物的产量即显著增加^[12]。

用高浓度的硫酸铜可引起紫草细胞产生应激状态, 导致紫草素的大量形成。最近, 利用渗透压诱导长春花悬浮培养细胞产生大量吲哚生物碱。吲哚生物碱产量达到 100mg/L, 其中主要成分是蛇根碱和长春花碱^[13]。

有些植物的愈伤组织及其悬浮培养细胞生长速度非常慢, 这是生产天然药物的主要障碍。因此, 还必须对其他途径, 譬如, 对生物合成途径、酶系的分离、鉴定与固相化及完整细胞固定化等技术进行积极的研究和开发, 以促使理想的化合物迅速形成。

由于支持物胶体本身的胶联方式, 使之对养料、水分及气体有一定的通透性, 在不同程度上维持细胞的生活力, 从而保证进行生化反应的酶系和辅助因子的存在。基于此原理, 在细胞产生次生产物的时期, 就将其固定化, 加以营养介质及底物进行反应; 或将其制成颗粒状, 注入柱式反应器, 就可进行连续循环反应。近年来的研究表明, 与悬浮培养的植物细胞相比, 在次生产物生产和生物转化方面, 运用固定化细胞利于次生产物的合成与积累, 能引起生长抑制的一些人工条件, 如温度、蛋白质和 RNA 抑制剂都能导致分化和次生产物的积累。固定植物细胞, 可承受压力增大和养料及通气的限制, 而使生长受到抑制, 高产细胞退化的可能性大为减少。使用固定化细胞, 更易控制和改变化学环境, 污染和损伤机会也大大减少, 从而便于使用反应器, 进行连续生产。

另一种解决悬浮细胞生长缓慢问题的方法, 是将植物细胞内编码次生代谢产物所需酶的基因植入细菌或真菌细胞。这样可使发酵时间由数周缩短到 1~2 天。可是一个复杂的化合物的全合成, 尚有赖于各种酶进行一系列的生化反应。这些基因若按一定的顺序排列, 并各带启动子以保证正确阅读, 按现代的 DNA 重组技术是做不到的。然而, 一步或两步酶促生物转化反应是有可能的^[14]。

2.3.3 存在问题及展望

由于一些瓶颈问题的限制, 到目前为止植物细胞生产次生代谢产物实现产业化的例子并不很多。这些瓶颈问题包括: (1) 次生代谢产物的生物合成途径等研究基础缺乏; (2) 经济可行性有限: 对于许多次生代谢物, 比如食品成分, 利用

细胞培养技术的生产成本要高于它的经济价值。目前，植物细胞培养中次生代谢产物浓度和产量都较低。代谢产品的含量低，由此造成成本和产品价格高。事实上，代谢产物的终产量要依赖于其日产量、生物体的生长速率及主要的生物量水平，因此提高培养体系生产效率时需要生物和工程两方面知识的综合应用。经济可行性问题需通过稳定高产株系的建立、培养条件优化解决。而要实现高生物量水平，需要为细胞提供充足的生长空间以及养料；同时目的产物向培养液中分泌的体系是非常理想的，这样利于降低后续分离成本，要实现这些目的，除了要对生长动力学、体系形态、细胞与细胞间的关系有清楚认识外，对代谢物生物合成路径的研究尤显重要。

参考文献

- [1] 邱忠毅. 细胞工程技术的应用 [J]. 生物化工, 2018, 004(004):140-143.
- [2] 汪勋清, 刘录祥. 植物细胞工程研究应用与展望[J]. 核农学报, 2008, 22(005):635-639.
- [3] 樊亚敏, 贺爱利. 浅谈植物组织培养的发展与应用[J]. 吉林农业, 2013(03):132-133.
- [4] 余琼. 植物组培技术中的应用[J]. 生物技术世界, 2014(2):204.
- [5] 郝建平, 陈柔如. 植物细胞工程进展[J]. 河南科学, 1999, 17(6):168-171.
- [6] 成静, 郭勇. 植物细胞工程药物生产的研究进展 [J]. 江西科学, 2000(1):60-62.]
- [7] 靳坤, 李洋, 李乾, 等. 我国生物制药研究进展及展望 [J]. 现代生物医学进展, 2012(2):370-372, 376.
- [8] 段迎霞. 药用植物干细胞培养技术的应用分析[J]. 化工管理, 2019(08):120.
- [9] Ketchum R, Gibson D M, Croteau R B, et al. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate[J]. 1999, 62(1):97-105.
- [10] Li D F. Several countermeasure on development of ginseng market [J]. J Chin Med Mater , 1995, 18(5):261-262.
- [11] 胡之璧, 顾者珉. 药用植物的细胞培养[J]. 国外医学.药学分册, 1987(03):3-10.
- [12] Heinsteins P F: J Nat prod, 1985,48(1):1.
- [13] GigerER. Pharm Zeit, 1985,(37):10.

附件 2

《天山雪莲培养物》等 2 个团体标准起草组成立会议纪要

会议时间：2021 年 2 月 1 日

会议地点：腾讯线上会议

参会人员：刘汉石、袁媛、刘禹、刘雅萍、李晓琳、范文霞、赵玉洋、秦双双、杨梦楠、南铁贵、谢冬梅、曹坦、周骏辉、刘学冬、张宏、龙则河、徐彩萍、齐莹、苏荣生、何健、李晓敏、严建刚、黄红、朱爱松、朱昆明、陈梓、金银兵、张显林、吴俊罡、赵乔、黄利等。

会议纪要：

1. 袁媛研究员代表课题组对天山雪莲培养物等 2 个拟进行起草团体标准的研制背景、标准框架、编制计划等进行了汇报，与会专家听取了课题组的汇报，对上述 2 项团体标准研制的意义、目的、可行性进行了探讨，并提出了如下意见和建议。

- (1) 天山雪莲培养物其它药用植物细胞生产工艺成熟，已越来越多的应用于保健品、化妆品、替代药材开发中。鉴于市场应用的情况，需要制定天山雪莲培养物产品标准及药用植物细胞培养技术规程，以规范产品的生产和科学研究，具有广泛的应用前景。
- (2) 应确定两个团体标准规范的范围和内容，今后应用于哪些领域。
- (3) 基于天山雪莲培养物的企业标准，哪些质量要求和检验方法需要修改和完善？
- (4) 药用植物细胞培养和植物细胞培养有何区别？
- (5) 药用植物细胞培养拟包含的技术要点包括工作区条件的确定、主要仪器要求、清洗与灭菌要求、试剂与培养基、外植体的选择、灭菌、接种、继代与保存等。
- (6) 建议要充分考虑不同药用植物个性化问题，标准拟规定的所有流程和参数适用于所有植物，考虑标准普适性。

2. 正式成立天山雪莲培养物 2 个团体标准的起草组。

3. 最终根据起草组专家意见确定了 2 项标准编制工作的整体框架和详细计划。

4. 起草组专家对标准研制、标准推广等项目内容进行了分工。

附件3 起草人知情同意书

起草组成员知情同意书

刘汉石：

《药用植物细胞培养技术规程》（珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛）起草组（筹）邀请您加入标准起草组，作为经济学领域本标准的起草专家，本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容，并确认签字。

1. 标准类别：团体标准（中医类/中药类）

2. 标准内容简介：

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术，已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养药用植物细胞已有400多种，其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产，以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究，对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究，对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责：

制定标准编制工作计划，明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上，起草标准草案讨论稿、征求意见稿，修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明：

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
刘汉石	大连普瑞康生物技术有 限公司	高级工程师	经济学	lhs@practical-bio.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍，对此项工作和起草组成员职责充分了解，自愿加入本起草组。

签字：刘汉石

日期：2021.11.23

起草组成员知情同意书

袁媛：

《雪莲培养物》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为中药资源与鉴定领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

雪莲资源日趋枯竭,致使以雪莲为原料的上百家医药及保健品企业原料严重短缺。应用植物细胞工程技术生产雪莲细胞培养物,其化学成分和雪莲药材基本一致,是替代雪莲药材、保护雪莲资源的最佳途径。雪莲培养物2010年被批准为新资源食品,并已实现工业化生产。本标准将确定雪莲培养物的质量要求,检验方法和检验规则,从而规范雪莲培养物产品,实现雪莲培养物的标准化生产和质量控制,确保雪莲培养物作为保健品和生产原料使用时的优质、安全、稳定。

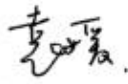
3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
袁媛	中国中医科学院中药资源中心, 珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心	研究员	中药资源与鉴定	13522054394

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 

日期:

起草组成员知情同意书

刘雅萍：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物工程领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
刘雅萍	珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心	正高级工程师	生物工程	liuyaping@practical-bio.com
我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。				
签字:刘雅萍				
日期:2021.11.23				

起草组成员知情同意书

秦双双：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为中药资源领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

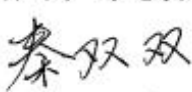
3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
秦双双	广西药用植物园	副研究员	中药资源	18078145166

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 

日期: 2021.11.20

起草组成员知情同意书

刘禹：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物化工领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
刘禹	大连普瑞康生物技术有限公司	中级	生物化工	

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 刘禹
日期: 2021.11.23

起草组成员知情同意书

李晓琳：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为中药种质资源领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

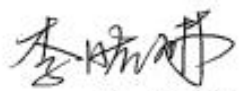
2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
李晓琳	中国中医科学院中药资源中心	副研究员	中药种质资源	13810018832
我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。				
		签字:		
		日期:	2021.11.15	

起草组成员知情同意书

谢冬梅：

《药用植物细胞培养技术规程》（珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛）起草组（筹）邀请您加入标准起草组，作为中药资源领域本标准的起草专家，本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容，并确认签字。

1. 标准类别：团体标准（中医类/中药类）

2. 标准内容简介：

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术，已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有 400 多种，其中 60 多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产，以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过 30 亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究，对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究，对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责：

制定标准编制工作计划，明确任务分工及工作进度。按 GB/T 1.1-2020 的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上，起草标准草案讨论稿、征求意见稿，修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明：

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
谢冬梅	安徽中医药大学	副教授	中药资源	13966680312

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍，对此项工作和起草组成员职责充分了解，自愿加入本起草组。

签字：谢冬梅
日期：2021.11.19

起草组成员知情同意书

陈梓：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物技术领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
陈梓	大连普瑞康生物技术有限公司	助工	生物工程	598141044@qq.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字:陈梓
日期:2021.11.24

起草组成员知情同意书

金银兵:

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物化学与分子生物学领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
金银兵	大连普瑞康生物技术 有限公司	中级	生物化学与分子生物学	yinbingking@163.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 金银兵
日期: 2021.11.23

起草组成员知情同意书

赵玉洋：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物技术领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
赵玉洋	中国中医科学院中药资源中心	助理研究员	生物技术	

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 赵玉洋

日期:

起草组成员知情同意书

张显林:

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为食品科学与工程领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
张显林	大连普瑞康生物技术有限公司	助工	食品科学与工程	Mact2008@163.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字:张显林

日期:2021.11.24

起草组成员知情同意书

周骏辉：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为生物技术领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

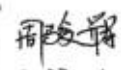
3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
周骏辉	中国中医科学院中药资源中心	助理研究员	生物技术	18510626047

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 

日期: 2022.5.7

起草组成员知情同意书

吴俊罡：

《药用植物细胞培养技术规程》（珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛）起草组（筹）邀请您加入标准起草组，作为发酵技术领域本标准的起草专家，本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容，并确认签字。

1. 标准类别：团体标准（中医类/中药类）

2. 标准内容简介：

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术，已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有 400 多种，其中 60 多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产，以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过 30 亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究，对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究，对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责：

制定标准编制工作计划，明确任务分工及工作进度。按 GB/T 1.1-2020 的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上，起草标准草案讨论稿、征求意见稿，修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明：

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
吴俊罡	大连普瑞康生物技术有限公司	中级	发酵	158109375@qq.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍，对此项工作和起草组成员职责充分了解，自愿加入本起草组。

签字：吴俊罡
日期：2021.11.24

起草组成员知情同意书

赵乔:

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为起草专家专业或方向领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别: 团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

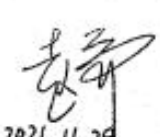
3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
赵乔	中国科学院深圳先进技术研究院	研究员	植物学	13552881231

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 
日期: 2021.11.29

起草组成员知情同意书

黄利：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为化学工程与工艺领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别: 团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
黄利	大连源盛泰医疗投资股份有限公司	无	化学工程与工艺	huanli@practical-bio.com 13764799867

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 黄利
日期: 2021.11.25

起草组成员知情同意书

张宏：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为医学领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。


3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
张宏	北京同仁堂健康药业有限公司	正高级工程师	医学	tingtingl_zhang@trtjk.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字:  2021.11.23

日期:

起草组成员知情同意书

朱爱松：

《药用植物细胞培养技术规程》(珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、袁媛)起草组(筹)邀请您加入标准起草组,作为中医学领域本标准的起草专家,本标准已向中华中医药学会提出立项申请。请您阅读知情同意书内容,并确认签字。

1. 标准类别:团体标准(中医类/中药类)

2. 标准内容简介:

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。迄今培养的药用植物细胞已有400多种,其中60多种代谢物含量高于或等于原植物。人参、紫草、报春花等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料的保健品、化妆品产值已超过30亿。开展药用植物细胞培养技术规程研究,对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究,对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义。

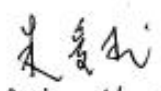
3. 起草组成员职责:

制定标准编制工作计划,明确任务分工及工作进度。按GB/T 1.1-2020的编写规定和标准制定工作程序完成标准草案的起草工作。在技术调查和充分研讨的基础上,起草标准草案讨论稿、征求意见稿,修改、完善和完成标准草案送审稿和报批稿。

起草组成员同意声明:

姓名	单位	职称	专业或方向	联系方式
朱爱松	浙江中医药大学	教授	中医学	liaoningzhongyi@hotmail.com

我已经阅读了上述有关本标准的内容介绍,对此项工作和起草组成员职责充分了解,自愿加入本起草组。

签字: 

日期: 2021 11 23

《药用植物细胞培养技术规程》团体 标准项目调研报告

目录

1 项目目的	1
2 项目意义	1
3 标准实施单位情况调研	1
4 立项背景	2
5 可行性分析	3
6 药用植物细胞培养技术要求	6
6.1 工作区条件	6
6.2 主要仪器要求	7
6.3 清洗与灭菌要求	7
6.4 试剂与培养基	8
6.5 细胞培养	10
6.6 保存要求	11

1 项目目的

制定一个统一的药用植物细胞培养的标准总则，指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产，提高药用植物细胞培养物的品质，与国际接轨。

2 项目意义

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术，已成为珍稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。开展药用植物细胞培养技术规程研究，对清洗与灭菌、培养基的配制、外植体的选择与处理、接种、初代培养、继代培养及保存等关键技术进行标准化研究，对于指导和规范药用植物细胞培养的科学研究和生产具有重大意义，可规范和指导药用植物细胞培养物的生产和科学研究，实现药用植物细胞培养物的标准化生产，提高药用植物细胞培养物的品质，与国际接轨，有助于促进国际贸易，具有广阔的应用前景。

3 标准实施单位情况调研

本标准的实施单位包括：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。

2011 年 12 月，经国家发展与改革委员会批复，大连普瑞康生物技术有限公司联合中国中医科学院中药资源中心、北京同仁堂健康药业有限公司共同组建珍稀濒危药用植物国家地方联合工程中心（简称

“工程中心”)。工程中心以珍稀濒危药用植物种质保存、细胞培养、细胞原料应用为研究重心,实施产、学、研、用一体化合作,搭建现代生物技术研发平台,运用植物种质复合保存技术、多样化细胞培养技术、植物细胞工程技术、细胞原料转化技术等,对我国珍稀濒危药用植物进行创新性的研究与开发。

4 立项背景

药用植物细胞工程已越来越多应用到中药资源开发中。药用植物细胞培养是用来生产药用活性成分或进行药用植物无性系快速繁殖的生物技术,已成为稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。利用植物细胞工程技术生产植物来源的生物产品,是植物细胞工程的一个重要领域,利用细胞悬浮培养、固定化细胞培养和毛状根培养技术设计生物反应器,可以实现植物来源生物产品的规模化生产。迄今通过植物细胞工程培养的药用植物细胞已有 400 多种,其中有 60 多种代谢物含量高于或等于原植物,应用范围包括生产天然药物(人参皂苷、地高辛、紫杉醇、长春碱、紫草宁等)、食品添加剂(花青素、胡萝卜素、甜菊苷等)、生物农药(鱼藤碱、印楝素、除虫菊酯等)和酶制剂(SOD 酶、木瓜蛋白酶)等。人参、紫草、报春花、洋地黄、天山雪莲等药用植物细胞已实现了工业化生产,以药用植物细胞为原料开发出的保健品、化妆品产值已超过 30 亿。目前我国学者已经建立了长春花、人参、丹参、三七、三尖杉、忍冬、红花、黄连、西洋参等几十种药用植物的液体培养系统,并实现了人参的 10 L 体积的大规模培养。利用植物细胞培养来生产药用活性成分或替代药物资源已成为稀濒危药用植物可持续发展的重要途径。

植物细胞工程技术呈现发展规模化、管理规范化和操作自动化的

趋势。目前国外一些国家在组织培养实验室、种苗快繁的质量管理以及植物来源生物产品的生产和质量管理中实行良好实验室规范(GLP)、良好生产规范(GMP)和危害分析和关键控制点(HACCP)系统。我国一些植物快繁企业也开展了 GMP 论证。植物细胞工程技术在产生巨大的社会效益的同时,必然对其技术产品的质量提出更高的要求。

目前国内动物细胞体外培养技术成熟,已建立相关的国家标准,如 GB/T 24863-2010 禽畜动物细胞体外培养和保存技术规程。植物组培技术也已制定了相关行业标准,如 LY/T 1882-2010 林木组织培养育苗技术规程、NY/T2306-2013 花卉种苗组培快繁技术规程、DB/T 752-2009 植物种苗快繁技术规程等。但植物细胞培养相关的技术规程或标准总则尚处于空白。由于缺乏统一标准,导致药用植物细胞培养物的生产和质控非常混乱,不利于规范和指导药用植物细胞培养物的生产和科学研究。因此亟需制定一个统一的、可全国范围内应用的药用植物细胞培养和保存的标准总则。

5 可行性分析

国际上,植物细胞技术研究水平较高、有较长的应用历史且在已有较为广泛的产业应用。药品方面,成功应用植物细胞培养技术进行药用物质的商业化生产,代表性案例有小檗碱衍生物、莨菪碱、鬼臼毒素和紫杉醇等;食品方面,已有 Teupolioside (来源于夏枯草细胞培养物的苯丙素苷类化合物)和紫锥菊甙(紫锥菊细胞提取物)在市场上销售。植物细胞技术在化妆品原料生产上的应用在过去的 10 年内发展尤为迅速,超过 50 余个植物细胞提取物品种进入欧美化妆品行业,如光果甘草提取物、积雪草提取物、姜黄提取物以及紫丁香提取物等。

大连普瑞康生物技术有限公司是国内外药用植物细胞培养研发时间较长、技术成熟的企业，已建立一套完整的技术平台和成熟的植物细胞培养工艺流程，建立了 100 余种药用植物细胞库。

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等围绕药用植物细胞培养、组织培养、化学成分、质量标准等开展了大量的研究。主要起草人发表的与该标准内容相关的研究文献 15 篇，其他起草人发表的与该标准内容相关的研究文献 20 篇。主要起草人发表文章如下：

[1].陈顺钦, **黄璐琦**, **袁媛**, 罗毓健, 陈平, 光照对黄芩悬浮细胞内源激素与有效成分相关性的影响, 中国实验方剂学杂志, 2010-04-20 期刊

[2].陈顺钦, **袁媛**, 罗毓健, **黄璐琦**, 陈平, 光照对黄芩黄酮类活性成分积累及其相关基因表达的影响, 中国中药杂志, 2010-03-15

[3].刘娟, 纪瑞锋, 陈同, **袁媛**, 郭娟, 王英平, 高文远, **黄璐琦**, 人参皂苷生物合成基因组织表达特性的研究, 中国中药杂志, 2017, 42(13)

[4].刘爽, 查良平, 杨健, 赵玉洋, **袁媛**, **黄璐琦**, 刘勇, 雪莲鲨烯合酶 SiSQS1 和 SiSQS2 调控 β -谷甾醇合成机制研究, 中草药, 2016-09-12

[5].吕冬梅, **袁媛**, 詹志来, 药用植物大规模组织培养的相关问题探讨, 中国中药杂志, 2014-09-01

[6] 游云; 蒋超; **黄璐琦**, 试析植物干细胞与动物干细胞的异同, 中国中药杂志, 2014-01-15

[7] 袁杰,王升,刘亚辉,李佳兴,周良云,李钡,周利,张文晋,郭兰萍,**黄璐琦**.欧洲花楸悬浮细胞对生物胁迫的记忆功能初探.中国中药杂志,2021:1-9.

[8]张睿,吴晓毅,马宝伟,陈上,王秀娟,高伟,**黄璐琦**.不同浓度脱落酸对雷公藤悬浮细胞萜类次生代谢产物累积的影响.世界中医药,2018,13(02):264-270.

[9]王升,谢腾,周良云,吴志刚,张燕,陈美兰,**黄璐琦**,郭兰萍.两种新疆紫草细胞系紫草素生物合成关键酶基因的表达差异分析.中华中医药杂志,2014,29(05):1356-1361.

[10]王升,谢腾,叶和春,林淑芳,张燕,陈美兰,**黄璐琦**,郭兰萍.新疆紫草 2 种悬浮细胞生长及紫草素类化合物积累的动力学研究[J].中国中药杂志,2013,38(08):1138-1144.

[11]张瑜,杨健,赵玉洋,杨光,**袁媛**,刘雅萍.UPLC-MS/MS 法测定四种天山雪莲培养物中九个维生素类成分含量[J].中国现代中药,2017,19(12):1697-1701.

[12]刘爽,查良平,杨健,赵玉洋,**袁媛**,**黄璐琦**,刘勇.雪莲鲨烯合酶 SiSQS1 和

SiSQS2 调控 β -谷甾醇合成机制研究[J].中草药,2016,47(17):3079-3086.

[13]胡国强,陈顺钦,袁媛,伍翀,林淑芳.外源生长素对黄芩悬浮细胞有效成分和内源激素含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):127-130.

[14]杨兆春,袁媛,陈敏,帅凌飞,肖倩,林淑芳.PEG 胁迫对黄芩黄酮类有效成分积累及相关基因表达的影响[J].中国中药杂志,2011,36(16):2157-2161.

[15]帅凌飞,袁媛,陈平,林淑芳.黄芩体内 H₂O₂ 清除系统和黄酮类活性成分积累的相关性研究[J].中国中药杂志,2011,36(13):1707-1710.

依托珍稀濒危药用植物国家地方联合工程研究中心、国家中医药管理局特色人才培养基地开展该团体标准的推广。该团体标准的推广计划如下：

标准培训将通过网络的形式或借助学术会议举办全国范围的标准培训班，面向全国植物细胞培养物生产企业、原料使用企业、销售企业、科研院所的相关人员宣传、推广《药用植物细胞培养技术规程》这一团体标准，指导如何运用标准生产、质控和开展科学研究等。此外，通过邮件、电话、微信等形式指导标准应用，并对标准应用过程中的问题进行咨询和解答。

标准应用将面向全国植物细胞培养物生产企业、原料使用企业、销售企业、科研院所推广《药用植物细胞培养技术规程》这一团体标准，指导标准应用，并对标准应用过程中的问题进行咨询和解答。

媒体宣传将通过网页、微信公众号、中药相关的网络平台等进行标准的宣传和推广；通过在学术会议做相关报告、发放宣传资料来进行标准的宣传和推广。

6 药用植物细胞培养技术要求

6.1 工作区条件

工作区一般要由洗涤间、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。

6.1.1 洗涤间

配置多个洗涤水槽、工作台等，地面应防水、防滑，水槽处墙面应防水。

6.1.2 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。

6.1.3 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。

6.1.4 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 m²，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。

6.1.5 培养间

培养间地面、墙面要求同 4.4。为了控制培养温度和光照，仅配备一个通气窗，并安装排风扇；配置空调、光照控制系统、紫外灯、除湿机、光照培养架、暗培养柜、培养箱、摇床等，可实现暗培养和可控的光照培养。

6.1.6 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。

6.2 主要仪器要求

超净工作台、冰箱、鼓风干燥箱、高压蒸汽消毒器、电子天平、培养箱、超纯水装置和磁力搅拌器等。

6.3 清洗与灭菌要求

6.3.1 清洗

6.3.1.1 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。

浸泡：用洗涤剂浸泡 6~24 h;

刷洗：用软毛毛刷反复刷洗;

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;

干燥：60℃下烘干或倒置晾干。

6.3.1.2 初次使用玻璃器皿及器械清洗

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 12~24h，然后再冲洗、干燥，具体步骤同 6.1.1。

6.3.1.3 严重污垢器皿及器械清洗

严重污垢器皿在经浸泡、刷洗后应置于 4%的重铬酸钾洗液浸泡 4h~24h，然后再冲洗、干燥，具体步骤同 6.1.1。

6.3.1.4 污染器皿及器械清洗

污染器皿及器械应先按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。

6.3.1.5 塑料与橡胶器皿及器械清洗

塑料和橡胶材质的器具在经浸泡、刷洗后，应用 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。浸泡、刷洗、冲洗、干燥步骤同 6.1.1。

6.3.2 灭菌

6.3.2.1 器皿和器械灭菌

塑料和橡胶材质的器具应在 0.073 MPa 的压力下高压灭菌 10 min。其余器皿及器械应在 121℃、103kPa 的压力下高压灭菌 15~30 min。

6.3.2.2 培养基灭菌

培养基灭菌分为高压蒸汽灭菌和过滤灭菌。培养基通常采用高压蒸汽灭菌，即在 121℃、0.10 MPa 下高压灭菌 15~20 min。过滤灭菌常用于液体培养基或培养基母液的灭菌，可将培养基全部过滤灭菌，也可将热不稳定的成分单独溶解后过滤灭菌，再添加到经过高压蒸汽灭菌后的培养基中。

6.4 试剂与培养基

6.4.1 水

实验用水符合 GB/T 6682 一级用水的要求。

6.4.2 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。

6.4.3 培养基

6.4.3.1 无机营养物

大量元素

用量较大的一类元素，包括 Ca、K、Mg、N、P 和 S 等，均以阴离子和/或阳离子的形式存在，配制浓度通常为毫摩数量级。等微量元素

指用量较小的一类元素，包括 B、Co、Cu、Fe、I、Mo、Mn 和 Zn，这些元素的配制浓度通常为微摩每升数量级。

6.4.3.2 有机营养物

有机物营养物多为蔗糖，为降低成本可用食用白砂糖代替。其它还有葡萄糖、麦芽糖、果糖、乳糖、半乳糖、山梨醇、甘露糖等。

6.4.3.3 维生素

通常用硫胺、盐酸吡哆素、烟酸和肌醇等。

6.4.3.3 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(,4-D)

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

③其他类 赤霉素(GA₃)、脱落酸(ABA)、乙烯等。

6.4.3.4 有机附加成分

①水解蛋白类：水解酪蛋白、水解乳蛋白等；

②酿酒副产品：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果汁：番茄汁、马铃薯汁、香蕉汁、橘子汁、李子汁、葡萄汁等；

凝胶：常用琼脂，还可用琼脂糖、卡拉胶、吉兰糖胶等。

6.4.4 培养基的配制

6.4.4.1 培养基母液配制和保存

根据培养基配方，分别配制大量元素、微量元素、铁盐、有机物、

植物生长调节物质母液。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 2 个月。

6.4.4.2 培养基配制、灭菌和保存

培养基配置

培养基的配置参照 LY/T 1882-2010 的 4.2.1。

培养基灭菌

培养基的灭菌按 6.2.2 执行。

培养基保存

灭菌后的培养基常温下应在 7 d 内使用。2~4℃条件下 14 d 内使用。

6.5 细胞培养

6.5.1 外植体的选择与处理

6.5.1.1 外植体选择

在生长适宜时期从具有典型性状的健康药用植物植株上选择芽、茎、鳞茎、根、花梗、种子、叶等较幼态的部位作为外植体。

6.5.1.2 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。

6.5.1.3 接种

6.5.1.3.1 操作准备

接种前的操作准备按 DB/T 752-2009 中 9.1 执行。

6.5.1.3.2 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 30s 以上，酒精灯灼烤时间应在 10 s 以上。

6.5.1.3.3 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 1cm），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。

6.5.1.4 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。

6.5.1.5 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暗。培养室的相对湿度为 60%，培养温度为 23~28℃。不同物种的培养温度不同，应选择适宜的培养温度。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。

6.5.1.6 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”。继代培养应交错进行，继代培养的时间间隔是由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。

6.6 保存标准要求

获得稳定的药用植物细胞后，可对植物细胞进行保存。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。