

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4522—2025

人参不定根组培技术规程

Technical code of practice for tissue cultured on ginseng adventitious root

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



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。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：中国标准化研究院、山东安然纳米实业发展有限公司、哈尔滨工业大学(威海)、深圳市标准技术研究院、中国林科院林业所、天津大学。

本文件主要起草人：席兴军、张明臣、刘金坤、高秀君、杨志花、刘冰、宋颜香、裴东、高文远、闫培生。



人参不定根组培技术规程

1 范围

本文件确立了人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)不定根组培流程,描述了设备设施与仪器、试剂和材料、培养基母液和培养基配制及保存、外植体前处理、组织培养、生产培养、清洗与干燥等阶段的操作指示以及信息记录与档案等证实方法。

本文件适用于以鲜人参根为外植体,以生产高皂苷含量组织培养物为目的所开展的不定根组织培养。

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 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

3 术语和定义

LY/T 1882—2010 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人参不定根 *adventitious root of *Panax ginseng**

人参种源诱导出愈伤组织、分化培养形成不定根,通过筛选获得工作种源,再经三级培养、清洗、干燥等步骤制得的产品。

3.2

分化培养 *differentiation culture*

再次培养过程中,愈伤组织经过分化形成了不定根的过程,也称为不定根诱导。

3.3

外植体 *explant*

用于植物组织培养的各种器官组织。

[来源:LY/T 1882—2010,3.3]

3.4

培养基母液 *medium stock solution*

按试剂种类和性质分别配制的高于培养基配方浓度的溶液。

[来源:LY/T 1882—2010,3.5]

3.5

诱导培养 *inducing culture*

在无菌条件下,将经体表面灭菌后的外植体植入培养基后,进行愈伤组织或不定根诱导的过程。

3.6

继代培养 *subculture*

外植体经过诱导培养后,再次及之后各次接种于新培养基继续培养的过程。

[来源:LY/T 1882—2010,3.7,有修改]

3.7

扩大培养 *extended culture*

将继代培养之后的不定根,转入体积逐级增加的新液体培养基,实现大规模快速生产的过程。

4 人参不定根组培流程

人参不定根组培流程见图 1。

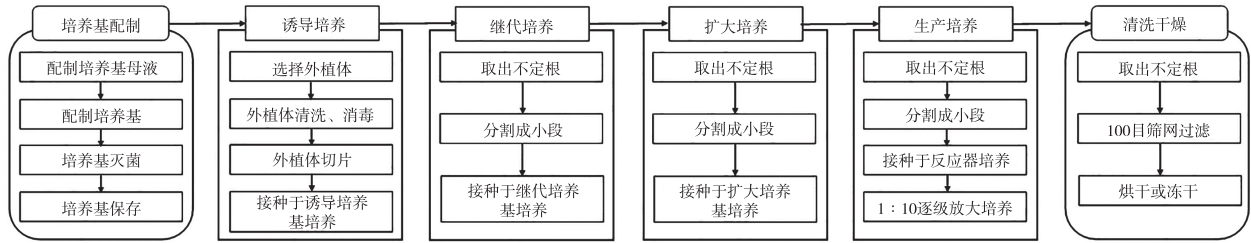


图 1 图 1 人参不定根组培技术流程

5 设备设施与仪器

5.1 设施

组织培养区域的空气洁净度应达到 10 万级以上;无菌操作间整体空气洁净度应达到万级以上;超净工作台应达到百级以上。

5.2 设备

- 5.2.1 超净工作台:不高于 ISO 5 级(100 级)、平均风速 0.30 m/s~0.60 m/s,需带紫外灯,功率 8 W 以上。
- 5.2.2 高压蒸汽灭菌器(锅):最高使用压力 0.255 MPa。
- 5.2.3 恒温恒湿培养箱或培养室:温度调节范围 0℃~60℃、相对湿度调节范围 40%~90%。
- 5.2.4 恒温振荡培养箱:温度调节范围 5℃~60℃、振荡频率 20 r/min~300 r/min。
- 5.2.5 烘箱:最高温度≥250℃。
- 5.2.6 冰箱:调节范围-20℃~0℃。
- 5.2.7 电子天平:感量 0.01 g 以下。
- 5.2.8 移液器(管):量程 1.00 mL、量程 5.00 mL。
- 5.2.9 pH 计:0.01 级 pH 计,最小显示值 0.01。
- 5.2.10 纯净水机组或装置:电导率应小于 5 μS/cm(25℃)。
- 5.2.11 生物反应器:具有剪切装置、具备可过滤 0.01 μm 的空气过滤器、食品级不锈钢材料、通气量为每升发酵液(培养基)每分钟通无菌空气 0.1 L~0.5 L。
- 5.2.12 无菌培养皿、手术刀、镊子、酒精灯等。

6 试剂和材料

- 6.1 蔗糖:食品级。
- 6.2 植物凝胶:植物细胞培养级。
- 6.3 B5 培养基:植物细胞培养级。
- 6.4 WPM 培养基:植物细胞培养级。
- 6.5 1/2 MS 培养基:生化级。
- 6.6 6-苄氨基腺嘌呤:植物细胞培养级。
- 6.7 萘乙酸:植物细胞培养级。
- 6.8 赤霉素:分析纯。
- 6.9 吲哚乙酸:植物细胞培养级。

- 6.10 吲哚丁酸:植物细胞培养级。
- 6.11 柠檬酸:植物细胞培养级。
- 6.12 抗坏血酸:植物细胞培养级。
- 6.13 纯净水:符合 GB 6682 中三级水的要求。
- 6.14 无菌水:经灭菌处理的纯净水。

7 培养基母液和培养基配制及保存

7.1 培养基母液

7.1.1 配制

- 7.1.1.1 配制用水为纯净水(6.13)。
- 7.1.1.2 母液配制方法见附录 A。

7.1.2 保存

- 7.1.2.1 母液容器应贴有标签,标签中标注名称、配置倍数、配制日期、有效期和配制人。
- 7.1.2.2 发现标签不明或母液中有沉淀或浑浊现象以及密封不严的应停止使用。
- 7.1.2.3 母液保存条件和标签内容按附录 A 执行。

7.2 培养基

7.2.1 配制

7.2.1.1 诱导和继代培养基

分别称取蔗糖 30.00 g、植物凝胶 3.00 g、B5 培养基 1.55 g、WPM 培养基 1.21 g,用移液器(管)移取 萘乙酸母液 20.00 mL、激动素母液 6.50 mL、赤霉素母液 3.00 mL、柠檬酸母液 6.50 mL、抗坏血酸母液 5.00 mL,用纯净水定容至 1 000 mL 溶液,调节 pH 在 5.70~5.90 后进行分装备用。

7.2.1.2 扩大培养基

分别称取蔗糖 40.00 g、B5 培养基 1.28 g、1/2MS 培养基 0.91 g、用移液器(管)移取吲哚丁酸母液 21.00 mL、萘乙酸母液 15.00 mL、赤霉素母液 4.00 mL、吲哚乙酸母液 3.00 mL、6-苄氨基腺嘌呤母液 3.00 mL,用纯净水定容至 1 000 mL 溶液,调节 pH 在 5.70~5.90 后进行分装备用。

注:按照量产规模等比例配制。

7.2.2 封口

将配制好的培养基及时盖好器皿口或采用封口膜封口。7.2.3 灭菌 7.2.3.1 培养基配制后应尽快灭菌;18℃~30℃温度下应在 8 h 内完成灭菌。7.2.3.2 灭菌方法

不同成分的培养基的灭菌方法如下:

- a) 培养基成分中含有植物激素和维生素 C 等成分时采用过滤除菌等温和方式灭菌;
- b) 除了植物激素和维生素 C 外的培养基成分采用高压蒸汽,灭菌条件为压力 0.105 MPa,灭菌温度和时间应符合表 1 的要求。灭菌完成后在超净工作台内将植物激素、维生素 C 按照配方用量加入基础培养基。

表 1 培养基灭菌条件

培养基容积,mL	灭菌时间,min	灭菌温度,℃
500~1 000	25	121(±1)
200 000~1 000 000	30	122.5(±1)

7.2.4 保存

7.2.4.1 诱导培养基、继代培养基

在超净工作台将灭菌后的培养基倒入无菌培养皿中,凝固后封口、编号,标示配制日期。在防尘、避光、18℃~30℃的常温条件下存放,7 d 内使用,2℃~8℃低温下存放,14 d 内使用。

7.2.4.2 扩大培养基

将灭菌后的培养基封口、编号,标示配制日期。在防尘、避光和 18℃~30℃ 的常温条件下存放,7 d 内使用,2℃~8℃ 低温下条件下存放,14 d 内使用。

8 外植体前处理

8.1 外植体选择

应选择无腐烂、无病疤的鲜人参根作为外植体。

8.2 外植体消毒

8.2.1 一次消毒

将外植体清洗干净放入超净工作台内,用 75% 的乙醇浸泡 30 s~120 s 消毒后,用无菌纯净水冲洗外植体 2 次~3 次。

8.2.2 二次消毒

外植体可选择表 2 中任一种消毒剂进行浸泡消毒。消毒时间应符合表 2 的规定。消毒后用无菌水冲洗外植体 4 次~6 次。

表 2 外植体消毒方法

消毒试剂	浓度,%	消毒时间,min
次氯酸钠	1~2	5~30
过氧化氢	10~12	5~15
次氯酸钙	9~10	5~30

9 组织培养

9.1 诱导培养

9.1.1 在超净工作台内将已消毒外植体切成厚度 0.2 mm~0.5 mm、长或宽 5.0 mm~7.0 mm 的不规则薄片,接种到诱导培养基中。

9.1.2 接种量为 1.5 g~6.8 g/L 或 1.5 g~6.8 g/1 000 g。

9.1.3 在恒温恒湿箱或培养装置中按以下条件下进行培养:

- a) 温度为 22℃~25℃;
- b) 湿度为 60%~80%;
- c) 避光培养 28 d~35 d。

9.2 继代培养

9.2.1 在超净工作台内将诱导出新的人参不定根,剪成 5.0 mm~10.0 mm 小段,转入继代培养基中。继代次数宜控制在 10 代以内。

9.2.2 在恒温恒湿箱或培养装置中按以下条件下进行培养:

- a) 温度为 22℃~25℃;
- b) 湿度为 60%~80%;
- c) 避光培养 28 d~35 d。

9.3 扩大培养

9.3.1 在超净工作台将继代培养出的人参不定根剪成长度为 10.0 mm~20.0 mm 的小段作为单体,每瓶放置 10 个~20 个单体,在装有扩大培养基的恒温振荡培养箱或培养瓶或小型培养装置内培养。

9.3.2 在恒温振荡培养箱、培养瓶或小型培养装置中按以下条件培养:

- a) 温度为 22℃~25℃;
- b) 转速为 80 r/min~120 r/min;
- c) 避光培养 28 d~35 d。

10 生产培养

10.1 生产用培养基配制

10.1.1 按扩大培养基配方,根据生物反应器的体积,在生物反应器中配制成生产用培养基。

10.1.2 将配制好的生产用培养基在温度 122.5 ℃,压力 0.105 MPa、灭菌时间 30 min,冷却后备用。

10.2 接种

10.2.1 在超净工作台中,将扩大培养的人参不定根剪切成 10.0 mm~20.0 mm 的小段。

10.2.2 可采用火焰接种法或压差接种法接种,操作方法按照附录 B 执行。

10.2.3 接种量为 3.0 g/L~6.0 g/L。

10.3 扩大生产用种子培养

在生物反应器中按以下条件培养:

a) 温度为 22 ℃~25 ℃;

b) 通气量为每升发酵液(培养基)每分钟通无菌空气 0.1 L~0.5 L;

c) 避光培养 28 d~45 d。

10.4 扩大生产培养

10.4.1 二级培养放大

将 10.3 条件下培养好的人参不定根,在原生物反应器中自动剪切为 10.0 mm~20.0 mm 的小段,按照 1:10 的放大比转入下一级生物反应器后,按 10:3 的培养条件继续扩大生产培养 28 d~45 d。

10.4.2 三级培养放大

将 10.4.1 培养条件下培养好的人参不定根,按 10.4.1 的方法和步骤继续扩大生产培养,获得人参不定根鲜根。

11 清洗与干燥

取出不定根,置于网孔直径小于 0.15 mm(大于 100 目筛)的尼龙网或不锈钢网上,以纯净水冲洗 1 min~3 min。而后置于 75 ℃烘箱中烘干至水分含量不高于 12 %,或冻干至水分含量不高于 12 %,在密封条件下保存。

12 信息记录与档案

应对人参组织培养过程的每个阶段,进行详细、准确、及时记录,并及时归档。档案保存期限 2 年以上。

附 录 A
(规范性)
母液配制及保存方法

母液配制及保存方法详见表 A.1。

表 A.1 母液配制及保存方法

母液名称	配制方法	保存温度, —℃	是否避光
柠檬酸母液	烧杯称取 15 g 柠檬酸, 少量纯净水溶解后倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	2~8	否
抗坏血酸母液	烧杯称取 10 g 抗坏血酸, 少量纯净水溶解后倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用去离子水定容、分装	—20	否
6-苄氨基腺嘌呤母液	称取 200 mg 6-苄氨基腺嘌呤, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
萘乙酸母液	称取 200 mg 萘乙酸, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
激动素母液	称取 60 mg 激动素, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
赤霉素母液	称取 200 mg 赤霉素, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
吲哚乙酸母液	称取 200 mg 吲哚乙酸, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
吲哚丁酸母液	称取 200 mg 吲哚丁酸, 用 2 mL~6 mL 无水乙醇溶解后, 倒入 1 000 mL 容量瓶中, 用纯净水定容、分装	—20	是
注: 母液 2℃~8℃下保存保质期 14 d, —20℃ 保存保质期 12 个月。			

附 录 B
(规范性)
生产培养的菌种接种方法

B.1 火焰接种法

B.1.1 将要接种的种子液在无菌操作台上集中到一个摇瓶中,瓶口在酒精灯火焰上加热 1 min,包扎好。

B.1.2 在发酵罐/生物反应器的接种口塞上酒精棉花。

B.1.3 将通入发酵罐生物反应器中的无菌空气的流速减小,打开排气口,降低生物反应器/发酵罐罐内的压力,但维持一定的正压。

B.1.4 拧松接种口上的塞子以排除罐内空气。

B.1.5 点燃接种口上的酒精棉花,待燃烧 1 min 后,拧开接种口的塞子。

B.1.6 在接种口上的火焰上打开装有种子液的摇瓶,将瓶口在火焰上烧烤。

B.1.7 在火焰上迅速将种子液倒入。

B.1.8 将接种口塞子在火焰上烧烤 1 min 左右,拧紧塞子,熄灭火焰,将发酵罐/生物反应器气量调大至可保持罐内或反应器内正压。

B.2 压差接种法

B.2.1 接种前在无菌操作台内将所有种子转移到已经灭菌好的容器中,将容器底部放料接口通过阀组与发酵罐/生物反应器连接,将容器底部管路与生物反应器/发酵罐上的接种管路一起使用蒸汽灭菌。

B.2.2 将生物反应器/发酵罐中的罐压降低,保持正压。

B.2.3 向接种容器内加压,高于生物反应器/发酵罐 20 kPa 以上。打开容器底部放料阀门与生物反应器/发酵罐接种阀门,开始接种。

B.2.4 在接种过程中,出口空气管路打开,以保持罐内的压力不会急剧上升,并保持一定的正压。

B.2.5 接种结束后,停止向容器内加压,将容器底部放料阀门与生物反应器接种阀门关闭并使用蒸汽灭菌连接管路,灭菌结束后再从生物反应器上取下容器。
