《**植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 细胞学评价法**》

(征求意见稿)

编制说明

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会《国家标准委关于下达2018年第二批国家标准制修订计划的通知》（国标委综合〔2018〕41号），项目编号“20181039-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国计量大学和中国标准化研究院等单位共同组成。

**二、标准制定目的及意义**

植物激素是植物细胞接受特定环境信号诱导产生的、低浓度时可调节植物生理反应的活性物质，因其在调节植物生长发育时表现出微量、精准的调控模式，因此陆续被开发为植物生长调节剂，其使用浓度低，效果好，在农业上应用十分广泛，统计表明我国农产品收益的相当比例来自于植物生长调节剂的正确合理使用。因此植物激素的研究一直受到科研领域、工业生产和农业应用收到密切关注。

植物激素种类繁多，国外针对植物激素活性研究继而开发的植物生长调节剂中有效成分多达100多种，且剂型丰富，而我国对植物激素类次生代谢产物研究起步较晚，总体处于跟跑阶段，且产品同质化严重，有效成分物质少，剂型单一、研制进度慢，田间复配药剂出现药害概率高等问题，缺乏核心竞争力。主要原因是其活性测定和功效评价缺乏统一的试验方法和标准，以植物激素类次生代谢物为主要活性成分的产品质量控制缺乏统一的标准和先进的技术等。因此，本课题拟在前期工作基础上，研究建立植物激素类活性物质的活性测定、功效评价技术等相关标准。研究结果将为以植物激素类次生代谢产物为主要活性成分的活性评价、产品研发和质量控制提供强大的技术保障，有效推动次生代谢物产业的发展。

植物体内产生的激素有五大类，即生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯，存在多种具有类似生物活性的化合物，活性不一，其中吲哚乙酸（IAA）为主要的天然生长素，但是其极不稳定，从而通过人工合成了萘乙酸（NAA）、4-氯-IAA、5-羟-IAA等结构功能类似物，主要作用于于细胞的生长，特别是细胞的伸长；玉米素（ZT）是主要的天然细胞分裂素，主要作用于细胞分裂及分化，除玉米素外，植物中至今已发现了十几种具有类似生理活性的物质，以此为基础，人工合成开发了6-糠基氨基嘌呤、6-苄基氨基嘌呤等结构功能类似物；脱落酸（ABA）是主要的植物天然生长调节剂，主要导致休眠和促进脱落，天然活性脱落酸的提取成本较高，而传统的化学合成法生产的脱落酸不仅成本高，且生理活性与天然的存在显著差异，至今只有美国等发达国家应用于大规模农业生产；赤霉酸（GA3）是活性最高的天然赤霉素，可以加速细胞伸长，促进细胞扩大，大部分通过赤霉菌发酵液分离提取，至今已分离鉴定出近百种生理活性类似的物质。由于同类激素中存在多种结构类似物，且结构、生产方式或剂型等不同，其生理活性则会产生差异，因此植物激素的生理活性很单纯难以浓度、纯度等进行判定。而生理活性差异则会直接导致产品质量参差不齐，使用效果不一。因此，对产品的生理活性进行测定评价是控制产品质量、保障使用效果的关键，也是促进新产品开发的基础。鉴于此，建立统一的生物活性评价标准具有重要意义，是植物生长调节激素类产品质量控制的保障，同时为新产品的开发鉴定提供标准指导。

鉴于产品使用效果的重要性，相关科研人员也从植物生长调节剂在促进或抑制植物生根、发芽、生长、开花、结果等方面展开了大量研究，国家也从农作物生长发育为出发点规定了植物生长调节剂用于调节小麦、水稻、棉花、玉米、黄瓜、番茄、葡萄、大豆生长以及在马铃薯抑芽调控，促进苹果着色、提高苹果果形指数、促进果树成花与坐果的田间药效小区试验的方法和基本要求，作为登记用的药效评价标准。而其余标准只规范了植物激素的测定方法，包括免疫法、薄层色谱、液相色谱等，都只能定量测定激素含量，而激素有效成分复杂，各成分间结构不同活性差异大，因此有必要制定统一的植物激素活性测定评价标准，以规范植物激素类产品的生产和使用，保障和促进该领域的健康发展。但是目前国内外均没有相关激素的活性检测标准。本标准的制定将填补相关空白，为科研和监管提供技术支撑。

**三、标准制定原则和依据**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》进行标准编写，标准内容参考了与植物激素活性检测相关文献，标准参照了 GB/T6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》第1部分总则与定义和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度》第2部分确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法。

标准的制定过程中采用文献调查法、专家座谈法、科学试验法等多种研究方法，确保方法的科学先进，过程周密严谨，保障数据真实可信、结果明确。

本标准是为相关组织对提取或合成的植物激素类次生代谢产物进行活性检测提供技术支撑，考虑到科研、生产、监管等不同需求，在方法选择上，主要基于产业现状、现有成熟的技术以及试验结果验证基础确定的，因此实用性较强。

同一类激素不同结构的活性物质在同等质量或浓度条件下各物质的生物活性不同，因此激素活性不能由物质质量或浓度来直接衡量。研究发现：植物激素可以通过与相应的激素受体结合，继而调节相关蛋白与其靶基因启动子序列内的增强子序列或抑制子序列结合而诱导或抑制靶基因表达。包括生长素响应元件AuxREs，赤霉素响应元件TATC-box，脱落酸响应元件ABRE，细胞分裂素响应元件ARR1AT。已有研究表明在特定激素范围内，靶基因的表达与激素浓度成正比，因此本项目以pCAMBIA1301骨架质粒，将原35S启动子用不同激素的响应元件重复序列+启动子核心序列替换，以GUS为报告基因，分别转染拟南芥，获得激素特异性响应的转基因拟南芥，以原生质体作为植物激素活性细胞水平的检测模型。以GUS蛋白诱导表达量来评价激素的活性水平。规范了材料的获取、测定方法要求等要素，同时以每类激素中活性高、稳定性强的天然活性物质或类似物为标准物，引入当量活性作为生物活性评价指标，即以单位浓度的植物激素类次生代谢产物与其相对应的标准物诱导产生的GUS蛋白表达水平的相对值来评价不同物质的活性。

**四、主要工作过程**

4.1、组成标准起草小组

根据国家标准制修订有关程序和要求，召开标准制定研讨会，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了标准初稿，对起草小组在标准起草过程中的一些思考及难点问题进行了深刻讨论，各单位代表就标准内容及方法选择进行了讨论。

4.2、开展相关调研情况

该标准属于生物产业领域的标准，是支撑科研开发以及生产方、第三方组织开展产品评价的技术依据。起草工作小组首先针对科研、生产和检测开展了大量的调研工作。从满足实际检测需要出发，开展了国内外相关资料的收集和确认工作，资料的检索和信息的收集过程中，分析比较了大量的国内外文献方法。

4.3、标准起草完善过程

在广泛调查研究的基础上，标准起草单位组织相关技术人员对项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外植物激素活性测定/评价的标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排，分析了通过前期的实验摸索、反复论证，确定了本标准方法设定的重要参数，开展了实际样品的检测。然后依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对本标准开展了起草工作。于2018年6月中旬，起草工作小组完成了《植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 细胞学评价法》国家标准（草案）。2018年12月，在杭州组织有关单位和专家分别召开了标准草案讨论会，重点对各个激素活性评价的重要指标选取提出了完善建议。同时对方法进行了验证，针对验证所出现的问题，在2019年2月22组织专家对标准逐字逐句进行了讨论完善，形成了《植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 细胞学评价法》国家标准征求意见稿。

**五、主要技术内容**

5.1 材料的选择及制备要求

植物激素主要通过与相应的激素受体结合，继而调节相关蛋白与其靶基因启动子序列内的增强子序列或抑制子序列结合而诱导或抑制靶基因表达。前期通过文献查询和专家咨询，确定了生长素响应元件序列：TGTCTCAATAAG，赤霉素响应元件序列CTATTCTCATT以及细胞分裂素响应元件序列AAGATCTTAAGATCTT能特异性响应，而响应序列的重复可以增强其对激素的响应，因此将以上序列做5~9次重复作为最终的激素响应元件重复序列，由公司合成。鉴于pCAMBIA系列载体及35S启动子在植物中的广泛应用取得较好的表达效果，因此我们选用35S启动子的核心元件与合成的激素响应元件重复序列结合，组成激素诱导型启动子（激素的响应元件重复序列+启动子核心序列），替换原pCAMBIA1301骨架质粒中的35S强启动子，以*GUS*为报告基因，分别转染拟南芥，获得激素特异性响应的转基因拟南芥。通过悬浮细胞、愈伤组织、原生质体材料的对比，我们发现，不论在材料获取简易程度还是材料的稳定性及培养溶液的干扰方面，原生质体材料均好于其它两种材料，因此本项目以构建的原生质细胞系为植物激素活性检测的细胞材料。

由于蛋白表达水平检测需求，我们对不同浓度的原生质体进行了蛋白测定，在可检出范围内，每个处理至少需要106cfu/mL的原生质体，因此本标准规定了初始活细胞材料的最低浓度。

5.2 GUS蛋白表达水平测定过程中的条件优化

我们推荐使用12格的细胞培养板，且用同一批的细胞系材料，以确保一个重复中的标准品和试样溶液能在相对一致的实验条件下，减少试验误差。

另外，我们比较了不同的GUS蛋白诱导表达时间对结果的影响，见图1，发现适宜浓度范围内的标准品诱导GUS蛋白表达的趋势基本一致，在诱导2~6 h范围内增长明显，而后期GUS蛋白表达水平基本不变，为了尽可能诱导GUS大量产生，因此推荐使用光照培养箱培养6 h。



图1 诱导表达时间对UGS蛋白表达水平的影响。

5.3 激素标准物的选择

试验发现同一浓度梯度的标准物（以细胞分裂素为例）ZT处理不同批次的ARR1AT-GUS细胞系，GUS蛋白表达水平不一致（图2A），因此无法单纯以GUS蛋白表达水平来评价激素的生理活性。且不同批次间，ZT浓度在10-5~10-3 mg/mL范围内，GUS蛋白的表达水平与ZT浓度的对数值均存在显著的线性关系（图2B），而同一批次ARR1AT-GUS细胞系用不同细胞分裂素活性的激素处理后，浓度在10-5~10-3mg/mL范围内，处理的GUS蛋白的表达水平与激素浓度的对数值均存在显著的线性关系，且斜率无显著差异（图2C），说明单批次试验中GUS蛋白的表达水平对细胞分裂素活性物质浓度的响应具有一致性，而批次间的差异可能和环境有关，因此我们引入当量的理念，用活性较高的细胞分裂素类标准物作为参照，计算与试样中有效成分对GUS蛋白的表达水平相当的标准物的量，作为试样中有效成分的细胞分裂素生物活性。由图2C所知，ARR1AT-GUS细胞系对天然细胞分裂素活性的玉米素ZT更为敏感，而对生长素活性和赤霉素活性物质无明显反应，表明ARR1AT-GUS细胞系可用于检测细胞分裂素活性，且本标准推荐ZT作为标准物来评价细胞分裂素类物质的生物活性。同理，图3表明，AuxREs-GUS细胞系对天然活性的生长素IAA和稳定的IAA结构类似物NAA都比较敏感，两者间无显著差异，且对细胞分裂素活性和赤霉素活性物质无明显反应，表明AuxREs-GUS细胞系可用于检测生长素活性，考虑到IAA容易降解，不利于试验的稳定性，因此本标准推荐采用NAA作为标准物来评价生长素类物质的生物活性。图4表明，TATC-box-GUS细胞系对GA3更为敏感，且对生长素和细胞分裂素活性物质无明显反应，表明TATC-box-GUS细胞系可用于检测赤霉素活性，本标准推荐采用GA3作为标准物来评价生长素类物质的生物活性。



图2 不同浓度细胞分裂素处理后GUS蛋白的表达水平

 

图3 不同浓度生长素处理后GUS蛋白的表达水平

  

图4 不同浓度赤霉素处理后GUS蛋白的表达水平

5.4 试样的制备

由于检测对象包含商品化的植物生长调节剂或生产研发过程中的未知物质，存在液体、固体等多种状态，为了便于统一，我们将单位浓度（mg/mL）的有效物质或未知物质的生物活性来计算激素活性。试验探索发现生长素在10-6~10-4 mg/mL浓度范围，细胞分裂素在10-5~10-3 mg/mL浓度范围，赤霉素在10-6~10-4 mg/mL浓度范围，诱导产生的GUS蛋白量与激素浓度存在显著的线性关系，而小于该浓度范围作用不明显，大于该浓度范围则浓度越高反而不利（见图2~4），因此我们需要多个梯度的试样进行观测，以排除高浓度的干扰。因此建议试验样品进行10倍梯度稀释，并至少取3个稀释浓度以便观察数据变化趋势，保证至少有一个试样浓度在线性作用范围内。

六、**验证情况及结果分析**

三种激素活性测定的标准物线性浓度范围见下表3

表3 测定方法中所用标准物的线性浓度范围

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 激素 | 可检测范围 |
| 1 | 生长素 | 10-6~10-4 mg/mL |
| 2 | 细胞分裂素 | 10-5~10-3 mg/mL |
| 3 | 赤霉素 | 10-6~10-4 mg/mL |

为了验证方法的重复性，每种激素选择了一种产品（生产厂家为四川润尔科技有限公司）分别委托杭州师范大学、浙江理工大学、浙江工商大学三家单位进行了验证，结果如下：

表4对氯苯氧乙酸钠（可溶性粉剂）的生长素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 生长素活性  （单位：E） | 0.136  0.132 | 0.140  0.143 | 0.139  0.136 | 0.141  0.146 |
| 0.138 | 0.136 | 0.153 | 0.139 |
| 平均值 | 0.135±0.003 | 0.140±0.004 | 0.143±0.009 | 0.142±0.004 |

重复性低于15%。

表5氯吡脲（可溶性粉剂）的细胞分裂素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 细胞分裂素活性  （单位：E） | 0.0189  0.0199 | 0.0191  0.0200 | 0.0190  0.0204 | 0.0193  0.0207 |
| 0.0196 | 0.0184 | 0.0200 | 0.0191 |
| 平均值 | 0.0195±0.0005 | 0.0192±0.0008 | 0.0198±0.0007 | 0.0197±0.0009 |

重复性低于15%。

表6 赤霉酸（可溶性粉剂）的赤霉素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 赤霉素活性  （单位：E） | 0.527  0.592 | 0.592  0.587 | 0.550  0.534 | 0.580  0.589 |
| 0.564 | 0.569 | 0.528 | 0.534 |
| 平均值 | 0.561±0.033 | 0.583±0.012 | 0.537±0.011 | 0.568±0.030 |

重复性低于15%。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准为推荐性国家标准。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

**十、其他应予说明的事项**

无其他事项说明。