

离子束诱变技术在海洋微藻培育中的应用

古绍彬, 姚建铭, 于 洋, 向 砥, 余增亮

(中国科学院 离子束生物工程学重点实验室, 等离子体物理研究所, 安徽 合肥 230031)

摘 要:以球等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 3011(简称微藻 3011)为材料, 对其进行离子注入诱变体系的建立及注入后的生物学效应的初步研究。结果表明, 用质量分数为 10% 的甘油培养液处理微藻 3011, 并收集藻泥均匀涂布于灭菌后的滤纸上, 风干后进行离子注入, 效果最为理想。不同剂量的 N^+ 注入后, 微藻 3011 存活曲线呈先降后升再降的“马鞍型”, 即当 N^+ 注入量为 $(0 \sim 9.1) \times 10^{14}$ ions/cm² 时, 存活率随注入剂量的增大而迅速下降; 当 N^+ 注射量为 $(9.1 \times 10^{14}) \sim (1.872 \times 10^{15})$ ions/cm² 时, 存活率随注入剂量的增大而有所上升, 但远低于对照组; 当 N^+ 注入剂量增大到 1.872×10^{14} ions/cm² 时, 其存活率又开始逐渐下降。此结果与紫外线、 γ -射线等其他射线辐照生物有机体存活曲线呈“肩型”或“直线型”不同, 但与离子注入陆地生物有机体后的存活曲线相近。本研究旨在探讨离子束生物技术应用于海洋生物体遗传改良中的可行性, 并为之提供科学依据。

关键词:球等鞭金藻; 离子注入; 生物学效应

中图分类号: S968.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)03-0247-04

1927 年 Muller 利用 X-ray 诱导果蝇突变获得成功^[1], 从此开辟了辐射诱变育种新领域, 在此后几十年的诱变育种工作中, 人们尝试了许多诱变手段, 如 X-ray、 γ -ray、中子束、电子束等, 并取得很大的成绩。传统的辐射诱变育种技术虽然成效显著, 但在育种工作中普遍存在 M1 代存活率低, M2 代突变谱窄, 重复性、方向性差和诱变效率低等不足。20 世纪 80 年代中期我国创立了低能重离子生物学, 并证实注入离子对植物和微生物均有良好的诱变效应^[2]。离子注入生物体集能量沉积、动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换 4 种作用于一体^[3], 同时又具有高 LET 值、集束性好、射程可控、能量沉积和质量沉积区域集中, 以及质、能、荷组合多等特点, 因此与目前其他的诱变源相比, 可以获得更高的突变率和更广的突变谱, 还具有一定的方向性和可控性。

低能重离子束生物学这一新兴的交叉学科在基

础研究和应用研究上均取得很大突破^[4~9], 但离子生物技术在海洋微藻育种中的研究在国内外尚属首次。离子注入工艺和注入参数对生物体诱变效率有很大影响。因此, 选择注入条件和深入了解注入剂量与微藻存活的关系对确定最佳注入离子种类、能量和注入剂量都将有重要的指导意义, 从而为海洋微藻育种工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 微藻 球等鞭金藻 *Isochrysis galbana* 3011 购于中国科学院海洋研究所。该藻种在“f/2”加富人工海水培养基中^[10], 20℃下保存, 每 3 周无菌转接 1 次新鲜培养基。

1.1.2 液体培养基 藻细胞的液体培养采用添加“f/2”的人工海水培养基, 人工海水用 I 型海水素(青岛海大通用海水素厂)配制。

1.1.3 固体培养基 于“f/2”加富人工海水培养基中加入 1.5% 的琼脂制得。

1.1.4 培养方法 藻细胞的培养在 LRH-250-G 型光照培养箱中进行。液体培养在盛有 150 mL 培养基的 250 mL 的三角瓶中接种适量球等鞭金藻种液,

收稿日期: 2001-11-12.

基金项目: 国家自然科学基金重大项目资助(19890300).

作者简介: 古绍彬(1975-), 男, 硕士研究生, 主要从事利用离子束生物工程进行海洋微藻育种的研究. Tel: 0551-5591327,

E-mail: sbgu@mail.china.com

使初始细胞浓度为 $(8 \sim 10) \times 10^4/\text{mL}$ 。固体培养在培养皿中进行。培养温度 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$;光照强度 $100 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,连续光照;pH 7.5~8.5。

1.2 N^+ 注入前样品的制备

取5 ml新鲜藻种液于3 000 r/min离心5 min,弃去上清,沉淀藻泥用含有质量分数为10%甘油的培养液重悬15~20 min,重悬液再经3 000 r/min,离心5 min,收集藻泥均匀涂布于灭菌后的滤纸上,风干后进行离子注入。

1.3 离子注入处理

离子注入在本所低能离子注入机上进行,能量为10 keV,剂量为 $(2.6 \sim 32.5) \times 10^{14} \text{ ions}/\text{cm}^2$,注入靶室的真空度为 10^{-3} Pa ,采用脉冲式注入,每个脉冲为5 s,间隔为30~50 s,以消除大剂量下热效应产生的负作用。

1.4 离子注入后的培养

N^+ 注入后立即在超净工作台上用新鲜无菌培养液洗下藻细胞并用移液枪充分打散,进行适当的稀释涂血,然后按1.1的方法进行培养,6 d后对固体培养基上藻细胞长出的单菌落进行观察计数并计算出相对存活率,相对存活率=各处理计数菌落数/真空对照计数菌落数。本实验把真空未接受离子注入的处理作为对照,各剂量处理下的存活情况为3次重复的平均值。

1.5 离子束辐照装置

研究所用的离子束辐照装置简图和示意图见图1和图2^[11]。离子注入装置由离子源、聚焦系统、质量分析、加速系统、真空系统、靶室和测控系统等基本部分构成。工作原理为:由离子源产生等离子体,其中的离子经引出系统引出,进入质量分析器选择,然后在加速系统中获得能量后,即可进行样品注入。其中真空系统是获得束线的基本保障,聚焦系统是控制束散而设置的。

2 结果与讨论

2.1 注入体系的建立

离子注入要求在真空干燥情况下进行,而球等鞭金藻却为圆形或者椭圆形的裸露运动细胞,没有细胞壁包裹。因此,保证裸露等鞭金藻在真空干燥情况下细胞不失水和在脱离培养液后细胞还处于存活状态是离子注入成功的关键问题。

通过培养风干不同时间(0~60 min,每个处理间隔5 min)的等鞭金藻细胞后发现,其脱离培养

液后能存活的最长时间约为15 min,超过这个时间细胞的存活就大大受到影响。若按微生物离子注入前的菌悬液或者孢子悬液直接涂血风干法对藻种进行处理,无法确保在15 min完成风干及注入的全过程。缩短藻种风干时间是建立离子注入体系中首要解决的问题。通过预备实验,发现把离心收集到的藻泥直接转移到无菌滤纸上,在滤纸完成吸水风干至可以注入的程度,前后时间不到3 min,这使细胞处于存活情况下进行离子注入成为可能。

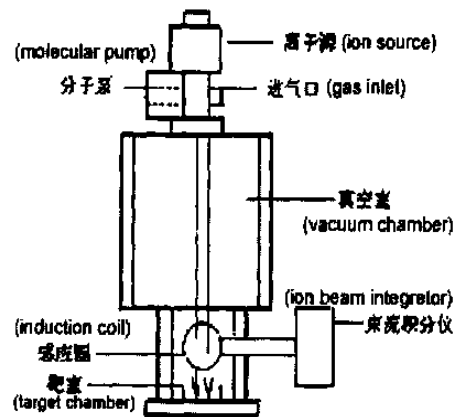


图1 离子束辐照装置简图

Fig. 1 Sketch of ion beam irradiation installation

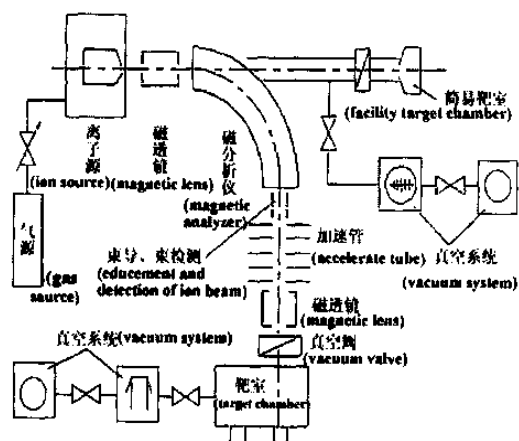


图2 离子束生物工程装置示意图

Fig. 2 Sketch of ion beam bioengineering device

按上述方法把准备好的细胞放入离子注入靶室进行注入,发现极少有细胞存活,即使是没有接受离子注入的真空对照也是如此。这是由于裸露的等鞭金藻细胞在真空干燥情况下失水使细胞在离子注入前就出现大量死亡。通过采用不同质量分数的甘油溶液(5%, 10%, 15%, 20%)和DMSO溶液(0.5%, 1%, 2%, 4%)作为保护剂对等鞭金藻进行处理后再进行离子注入实验,发现用含有质量分数为10%甘油的培养液处理后保护效果最理想,经过照射后仍可以观察到有一定量的细胞存活;而当保护剂浓度太低或太高结果都不理想,浓度太低保护效果差,浓度太高则负作用太强。

2.2 不同剂量的 N^+ 注入对3011存活率的影响

不同剂量的 N^+ 注入3011的存活曲线见图3。当 N^+ 注入剂量较小时,其存活率随着注入剂量的增大迅速下降;当剂量达到 9.1×10^{14} ions/cm²后,其存活率随着注入剂量的增大又逐渐上升;当剂量达到 1.872×10^{15} ions/cm²后,其存活率又逐渐下降,即呈现出一种先降后升再降的“马鞍型”存活曲线。这与紫外线和 γ -射线等其他射线辐照生物有机体后呈现“肩型”或“直线型”的存活剂量关系相比有明显不同。但是,此结果与离子束注入陆地生物有机体后呈现的剂量存活关系是相近的,说明离子束独特的诱变效应具有普遍性,也进一步证实离子束在诱变机理上与其他的辐射诱变源相比确有差异,因为离子注入除了具有能量沉积效应外,还有动量传递、质量沉积和电荷的中和与交换等效应^[3]。

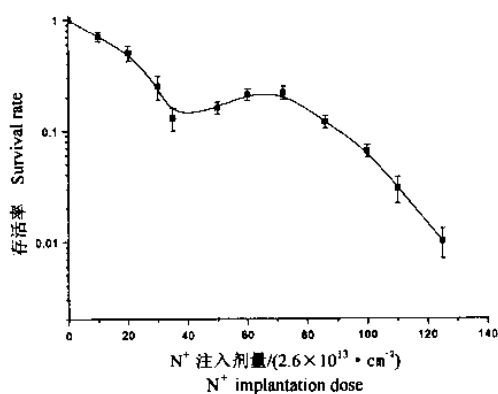


图3 N^+ 注入剂量对3011存活的影响

Fig. 3 Effects of N^+ implantation on survival rate of *Isochrysis galbana* 3011

在中低剂量下($0 \sim 9.1 \times 10^{14}$) ions/cm², 微藻3011存活率随着注入剂量的增大而迅速降低,这主要是能量沉积和动量传递共同作用的结果。能量沉积的结果是低能粒子直接作用导致DNA损伤与链的断裂^[12]和大量自由基的产生,而产生的自由基又将引起包括DNA在内的生物大分子及生物膜的损伤。动量传递的结果是细胞结构及亚细胞结构受到刻蚀损伤。同时,生物细胞在低剂量下的辐射敏感性^[13]也是其在低剂量下存活率迅速下降的原因。

在中高剂量下,等鞭金藻存活率随着 N^+ 注入剂量的增加而有所上升但又远低于对照组(100%存活率)。一方面说明能量沉积效应和动量传递效应仍然起着主要作用,同时又说明质量沉积效应和电荷效应在发挥作用。注入离子的电荷效应主要是通过电荷中和与电荷的交换、转移来减轻DNA与生物大分子的损伤;同时,注入离子的正电荷还可吸收辐射产生的 δ 电子使 $\cdot OH$ 和 $\cdot H$ 的产额降低^[14],减轻辐射损伤,提高存活率。另一方面,随着 N^+ 注入剂量的增加将导致其他一些效应的产生,如:大量电荷堆积后对细胞形成了一层“保护屏障”效应、弱电场效应等。离子注入质量沉积效应的结果是一些新物质的生成,这些新生成的物质对损伤细胞的修复有刺激效应。邵春林等^[15,16]曾提出注入离子的质量沉积产物对DNA有保护作用,因为质量沉积产物可与DNA等生物大分子竞争 $\cdot OH$ 等自由基,从而减轻损伤、提高存活率,同时在这些新生成的物质中有的还可能直接或间接参与一些修复基因的激活和修复酶活性的调节中。

随着注入剂量的增加,虽然质量沉积效应和电荷效应依然存在,但是对生物体来说,它们毕竟也包含着损伤因素,不可避免地造成新的物理、化学损伤;同时大剂量注入下的能量沉积效应和动量传递的结果将使得DNA及生物膜等生物大分子的损伤大大超过质量、电荷的保护和刺激效应及细胞本身的修复能力。因此,当 N^+ 注入剂量继续增大到(1.872×10^{15}) ions/cm²后时,其存活率开始逐渐下降。

注入工艺和注入参数对生物体诱变效率有很大影响,进一步优化注入条件和深入了解注入剂量与存活的关系对确定最佳注入工艺和最适离子注入参数(离子种类、能量和注入剂量)都将有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 冯宗云, 赵刚. 遗传学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1996. 189 - 192.
- [2] 讲泽慧, 彭镇华. 离子束应用于生物品种改良的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 295 - 298.
- [3] 余增亮, 霍裕平. 离子注入生物学研究述评[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3): 221 - 225.
- [4] 余增亮. 离子束与生命科学——一个新的研究领域[J]. 物理, 1997, 26(6): 333 - 338.
- [5] YU Zengliang. Mutation breeding by ion implantation[J]. Nucl Instr Meth, 1991, B(59/60): 705 - 705.
- [6] 吴丽芳, 李红. 离子束生物工程应用进展[J]. 物理, 1999, 28(12): 708 - 712.
- [7] 武宝山, 黄龙, 凌海秋, 等. 离子注入在生物工程上的应用[J]. 新疆工学院学报, 1999, 20(2): 114 - 116.
- [8] 苏一, 鲁光沅, 李毅. 离子注入在生物和农业上的应用研究[J]. 天津师范大学学报, 1997, 17(2): 20 - 26.
- [9] 罗先群, 王新广. 论实施海洋生物工程[J]. 海南大学学报(自然科学版), 1999, 17(2): 190 - 193.
- [10] Guillard R L, Ryther J H. Study for marine planktonic diatoms. I. *Cylotella nana* Hustedt and *Detonula confereacea* (Cleve) Grun[J]. Can J Microbiol, 1962, 8: 229 - 239.
- [11] 胡春栋. 200keV 强流离子束生物工程装置的研究[D]. 合肥: 中科院等离子体物理所, 1999.
- [12] Badia B, Pierre C, Darel H, et al. Resonant formation of DNA strand break by low - Energy (3 to 20eV) Electrons[J]. Science, 2000, 287: 1658 - 1660.
- [13] 夏寿萱, 陈家佩, 金瑾珍, 等. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 254 - 255.
- [14] 夏寿萱. 放射分子生物学[M]. 北京: 原子能出版社, 1992. 33.
- [15] 邵春林, 余增亮. 离子束辐射下微生物、植物组织存活模型的研究[J]. 核技术, 1997, 20(7): 423 - 429.
- [16] 邵春林, 余增亮. 低能离子辐射的刺激效应模型[J]. 核技术, 1996, 19(6): 321 - 325.

Marine microalgae culture by ion beam implantation

GU Shao-bin, YAO Jian-ming, YU Yang, XIANG Di, YU Zeng-liang

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: *Isochrysis galbana* 3011 samples were used as the experiment materials to establish the ion beam implantation system. The strain 3011 was treated in 'f/2' based culture medium containing glycerine (5%, 10%, 15%, 20%) or DMSO (0.5%, 1%, 2%, 4%) as the protective additive and the protective effect was the best with 10% glycerin. With the implantation of N^+ , the survival rate of strain 3011 declined at the first until the N^+ dose increased to 9.1×10^{14} ions/cm², i. e. the survival rate of strain 3011 got down rapidly with the increase of N^+ dose; but when N^+ dose increased from 9.1×10^{14} to 1.872×10^{15} ions/cm², the survival rate went up with the increase of N^+ dose, but was much lower than that in control (vacuum, without N^+ implantation, 100% survival rate); when N^+ dose increase to over 1.872×10^{15} ions/cm², the survival rate began to decline with the N^+ dose increase. So, the survival rate curve shows 'saddle-shaped', which is much different from the 'shoulder-shaped' one or 'straight-line-shaped' one by γ -ray, ultraviolet ray or other radiation sources. The purpose of this study is to research the possibility of ion beam implantation used in plasma modification of marine organisms and to provide reliable basic data on that.

Key words: *Isochrysis galbana*; ion implantation; biological effect