

## 离子束生物工程应用研究进展\*

吴丽芳 李红

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室 合肥 230031)

**摘要** 离子束生物工程学是一门首先兴起于中国的交叉学科.虽然仅有10余年的发展历程,但已在诱变育种、植物转基因、生命起源和进化以及环境辐射与人类健康等方面取得了一些重要的阶段性研究成果,开辟了具有重要理论和应用价值的研究方向,为遗传工程及相关领域提供了新的研究手段.随着离子束生物工程学的进一步发展,它还将在细胞加工、非对称细胞融合等方面发挥重要作用.

**关键词** 离子束生物工程,诱变育种,转基因,生命起源和进化,环境辐射与健康

### PROGRESS IN APPLICATIONS OF ION BEAM BIOENGINEERING

Wu Lifang Li Hong

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

**Abstract** Ion beam bioengineering is a cross-disciplinary subject which was first started in China. After over 10 years of development, it has seen significant achievements in many fields such as mutation breeding, plant gene transfer, life origin and evolution, environmental radiation and human health. Several new fields in theory and application have opened up, offering a new methods for genetic engineering and related domains. With its development, it will also play an important role in cell processes and non-equal cell fusion.

**Key words** ion beam bioengineering, mutation breeding, gene transfer, life origin and evolution, environmental radiation and human health.

#### 1 引言

雷电、辐射等自然现象是自古以来就存在的,然而这些自然过程中产生的低能离子与生物圈的相互作用关系却一直被人们忽视了.在离子注入生物效应发现以前,与低能离子相互作用的研究对象仅限于岩石圈中一些无生命的物质,而在辐射生物学发展的90年的时间里,研究的也都是能量沉积对生物造成的损伤,未曾涉及低能离子沉积对生命物质的作用.直到1986年,中国科学院等离子体物理研究所余增亮等人发现了离子注入对生物的诱变效应,证实了质量(粒子)沉积生物效应的存在<sup>[1]</sup>,开辟

了低能离子与生物体相互作用的新的研究方向,建立了质量、能量、电荷三因子作用机制体系,填补了重离子生物学研究的一段空白<sup>[2]</sup>.正如人们所预期的那样,现已发展成为“离子束生物工程学”这一新兴的交叉学科(也叫低能重离子生物学),受到国内外专家的关注<sup>[3,4]</sup>.经过10余年的努力,离子束生物工程学的理论和应用研究都已取得不少进展,在基础研究领域,为分子生物学、遗传工程等方面的研究提供了新的研究手段,新的实验证据使得人们对低能

\* 国家自然科学基金资助重大项目,国家重点科技攻关项目

1999-02-01 收到初稿,1999-04-13 修回

离子在生命起源中的作用有了新的认知.特别值得一提的是,离子束生物工程技术在工农业、医药业的应用带来了巨大的经济效益.目前,离子束生物工程技术日趋成熟,本文将就本学科的一些重要研究方向的进展情况作一介绍.

## 2 离子束生物工程与生物改良

现代科技发展的重要特点之一就是理论研究与应用的高度结合.离子注入生物效应的发现,为生物的遗传改良开辟了新途径<sup>[5]</sup>,其价值在应用后不久即显现出来.据统计,仅1994年至1997年,经离子束处理选育出的8个新品(菌)种,新增经济效益就达15亿元.

### 2.1 离子束生物工程与诱变育种

离子束在遗传改良上应用开展最早的是诱变育种.目前,在农作物诱变育种方面,离子注入改良的范围几乎涉及所有的主要粮食和经济作物.众所周知,作物产量、品质、抗性等性状往往是由多基因控制的数量性状,传统的诱变方法对这类性状的改良效果不佳,而离子束诱变技术在对这些数量性状的改良上效果显著.其原因在于离子注入除了像一般辐射一样由于能量作用引起DNA链断裂外,还由于质量、电荷的三因子协同作用引起大量受体原子移位、重组,形成新的分子结构和基团,产生丰富的基因突变,因而可以在损伤轻的情况下获得较高的突变率.这种诱变技术自应用以来,一直倍受青睐.经离子注入获得的有实用价值的育种材料已有3000余份,从中选育出的优良品种已在安徽、山东、浙江、江西、河南等省推广.已经通过审定的两个水稻新品种D<sub>9055</sub>和S<sub>9042</sub>,米质比原品种提高1—2个等级,对多种病虫害的抗性提高1—3级.D<sub>9055</sub>还被评为优质米新品种.这两个品种已在安徽、江西、湖北等省累计推广1100万亩,平均每亩较当地栽培品种增产30—50kg.后期通过省级审定的新品种中粳63和晚粳M<sub>3122</sub>的产量均较对照增产10%以上,而且米质优,抗逆性、抗病虫性好.经离子束诱变选育的小麦品种皖麦32号已通过品种审定,皖

9210在区域试验中表现突出,可望成为安徽地区的当家品种.安徽农业大学的研究表明,离子注入在诱导棉花变异的产生方面效果很好.另外,离子束在蔬菜育种上也显示了其应用价值,1997年,通过山东省审定的离子束注入改良番茄品种鲁番茄七号增产幅度达23.4%,且生长周期缩短.其他作物如玉米、大豆、烟草、甜菊、林木、茶树、甘薯、谷子等经离子束辐照后,都获得了一批有推广价值的新品系.

离子束在改良微生物方面也取得了丰硕的成果.现有的生产菌株对以日常用的物理化学诱变方法往往表现出不同程度的抗性,而离子束作为一种新的诱变源,表现出很好的应用效果.浙江农业科学研究院微生物研究所用离子束处理糖化酶生产菌,经过短短一年多的时间,即将酶活从1.5万发酵单位提高到2万单位,最高菌株达2.6万单位<sup>[6]</sup>.中国科学院等离子体物理研究所与国内数十个单位合作,以生产上使用的高产菌株为出发菌,大幅度提高了多种工业微生物发酵生产物的产量,已投入生产的微生物菌种有3个.1998年,姚建铭等用离子束诱变技术,得到了利福霉素菌株,其发酵水平较对照提高了40%,7t罐发酵试验中,效价最高可达6800u/ml(效价的高低是衡量抗生素质量的标准).1998年,许安等用此法获得的维生素C生产菌创国内外二步法发酵糖酸转化率新高,摩尔转化率最高达97.5%,而且这种菌种具有直接转化葡萄糖的能力,葡萄糖重量转化率可达50%.1998年,王纪等用离子注入技术诱变选育的维生素D生产菌的麦角甾醇酵母发酵水平提高50%以上,且传代稳定,已通过鉴定,小试和中试正在进行.淮南制药厂林可霉素出发效价2600u/ml,经中国科学院离子束生物工程实验室微生物攻关小组一年的诱变筛选后,效价达3100u/ml,提高了25%.经两年的筛选,之江菌素发酸水平由200单位提高到500单位,单宁酶的酶活提高了70%.经离子注入筛选的花生四烯酸生产菌发酵水平高于国外专利菌.

在植物和微生物改良蓬勃发展的同时,离

子注入改良动物的研究进展却较为缓慢.这主要是由于动物的可操作性较差造成的.这方面的研究主要集中在蚕上.安徽省农业科学研究所蚕桑研究所通过对经过辐照的蚕卵、蚕蛹的研究,发现一些特殊的生效效应,选育出一系列有利用价值的品系.相信随着离子束生物技术的不断发展,在动物改良上的应用一定会取得较大的进展.

## 2.2 离子束生物工程在创造新资源和远缘杂交方面的应用

品质资源缺乏一直是困扰农作物育种工作的一大难题,而经离子束生物技术处理获得的大量材料,为育种工作提供了丰富的素材.用紫玉米全 DNA 转化水稻得到的玉米稻新品系,茎秆粗,抗倒伏,光合速率比原品系提高 84%,区域试验中亩产在 650kg 以上(吴敬德等,1997).安徽农业大学用离子束处理玉米得到的高光效多穗型材料——对生玉米,对玉米高产育种是一种极其宝贵的中间材料.华中农业大学用氮离子注入水稻无融合生殖材料,使后代无融合生殖率从 14% 提高到 48%,这对水稻杂种优势一系法(一系法是通过无融合生殖途径,利用远缘杂种间的杂种优势的一种方法)利用具有重要意义.安徽省农业科学院用同样方法育成的具有温敏型黄化标记性状的光敏核不育系,对水稻杂交制种及杂种鉴定都具有重要意义<sup>[6]</sup>.

远缘杂交是创造新物种和向异源物种转移有利基因的重要途径,具有重大的理论和实践意义.但由于亲缘关系较远的物种间存在生殖隔离,会出现远缘杂交中的不亲和现象,使杂种不结实.因此,有关提高远缘杂交结实率的研究无疑是十分有意义的.崔海瑞等对离子注入对小麦远缘杂交结实率影响的研究结果表明, $N^+$ 注入父本或母本都有助于克服远缘杂交不亲和性,明显提高杂交结实率,一般提高 1—6 倍<sup>[7]</sup>.看来,离子注入对于生物体的作用是多方面的.

## 2.3 离子束介导转基因研究进展

遗传转化是基因工程的一个重要研究方向.已经应用于植物转基因的方法有 10 种以

上<sup>[8]</sup>,这些方法各有优缺点.为了使转化技术更加完善和成熟,科学家们一直在不断探索,寻求方便、高效的转化方法.离子束介导转基因技术,是 1989 年由中国科学院等离子体物理研究所余增亮研究员首先提出来的.这种技术的原理是利用离子束对植物细胞的刻蚀作用,造成受体细胞表面的损伤和穿孔,从而引起细胞膜透性和跨膜电场的改变,将外源基因引入植物细胞.据此原理,安徽农业科学研究所将  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因和潮霉素抗性基因(hph)分别导入水稻种胚细胞,获得转基因植株<sup>[9,10]</sup>.最近,中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室在此方面的研究取得了进一步的成果.转基因烟草经 PCR(polymerase chain reaction)分析和核酸分子杂交检测,证明 GUS 基因确已转入烟草,并得到表达;以质粒为载体的几丁质酶抗性基因转化水稻和小麦也获得成功,标志着离子束介导转化的供体由报告基因转向目的基因.在总结多种植物的多品种转化经验的基础上,离子束介导转基因方法的技术体系已经初步形成.

以质粒为载体的植物遗传转化为作物定向改良带来了希望,但成功的例子并不多.而且一些重要的经济性状往往都是多基因控制的数量性状,这些基因分布于同一染色体不同位置,甚至不同的染色体上,牵涉的 DNA 区段较大,克隆困难,所以以质粒为载体转化这类基因不很容易.因此,近年来植物总 DNA 转化技术得到了发展,特别是借助离子束介导转移活性裸露 DNA 大分子已成为当前引人注目的一个研究方向<sup>[4]</sup>.中国科学院等离子体物理研究所与安徽农业科学研究所合作,用离子束介导法将紫色玉米全 DNA 转入水稻,获得了 3 个玉米稻新品系,在区域试验后将大范围推广.安徽农业大学用比克氏棉和红麻 DNA 转化泗棉 2 号,获得了高抗枯萎病的棉花新品系<sup>[11]</sup>.

转基因的方法很多,但作为一种新的导入外源基因的方法,低能离子束介导的外源基因转移技术的突出优点是:(1)利用种子胚和愈伤组织等作为外植体,便于取材和批量操作,同时

物理

也省去了原生质体制备和再生植株麻烦,是一种方便、有效的外源基因转移技术。(2) 由于向生物细胞注入的是带电荷的离子,带正电的离子注入后,电荷交换使微通道积累正电荷,便于吸引带负电的外源 DNA 主动进入细胞。(3) 利用离子束作用体时存在峰值,如果对峰值控制得当,就可以对微通道内的部分染色体造成损伤,便于外源 DNA 与受体细胞 DNA 的重组和整合<sup>[12]</sup>。

### 3 离子束生物工程与生物起源和进化的研究

原始地球上的有机小分子最初是如何形成的? 生命的起源问题一直是人们研究的重点和关注的热点。一般认为:原始地球上生物小分子的合成主要在气态和液态环境中进行,即在大气圈和水圈(海洋)中进行,而中国科学院等离子体物理研究所通过低能离子注入生物小分子的研究,有了新的发现: $N^+$  注入乙酸钠可形成甘氨酸钠<sup>[13]</sup>, $N^+$  注入甲酸盐、乙酸盐不仅能形成腈基,而且能形成环状氨,溶于水后形成了新的氨基酸<sup>[12]</sup>。由此可以推测,原始大气中的氮电离后,注入并沉积到地表有机盐分子中引起靶原子移位和重排,可能是最初生物有机小分子形成的重要途径之一。这一发现无疑为增加人们对原始地球生命化学进化过程的认识又增添了全新的内容——土壤可能是生命起源的重要场所。

进一步的研究表明,氮离子等低能离子的辐射作用不仅与生命起源有关,在生物的进化中也起着重要作用。在整个自然界,辐射无时无刻不存在着。在生物圈内,荷能离子不管从何处来,总有一部分会注入到生物细胞,直接作用于遗传物质,引起 DNA 链的断裂,同时,通过质量、能量、电荷多因子作用于周围的分子,造成局部原子移位、重组、基因修饰等多重损伤,引起基因突变<sup>[14]</sup>。这方面的证据之一就是氮离子注入遗传物质组分的研究。用占注入样品总氮量 2.9% 的氮离子注入 DNA 的 4 种碱基之一

的胸腺嘧啶,可使后者产生大量氨基,氨基含量提高 30%,这说明新的氨基基团主要来自移位原子,而不是注入氮离子。另外,由于注入离子带电荷,电荷交换效应可使细胞表面电性和跨膜电场改变,从而深刻影响着细胞内外能量交换、物质运输、细胞通信等生物学过程,造成变异<sup>[12]</sup>。大量的变异,为新物种的产生和生物的进化提供了丰富的素材。因此,研究低能离子与复杂生物体系相互作用的机理,对于揭示自然界进化的奥秘具有重要意义。

### 4 离子束生物工程与人类健康

生活在地球上的人们每天都承受着各种各样的辐射。尤其是当今世界环境日益恶化,大气层遭到严重破坏,移动电话、微波炉进入千家万户, $\gamma$ -刀等辐射疗法的使用,使得辐射与我们日常生活的关系愈来愈密切。在这种情况下,有关环境低剂量辐射对人类健康影响的研究就显得特别迫切和重要。

从 50 年代起,欧洲和美国的一些科学家就进行了相关研究,如紫外微束、电子束微束、激光微束等用于低剂量辐射研究。然而,这些系统中所采用的剂量仍然较大,故对环境低剂量照射危险性估计、重离子注入肿瘤的细胞学效应等一直缺乏精确的实验数据。最后,中国科学院等离子体物理研究所与美国哥伦比亚大学医学院联合培养的博士生吴李君用精确数量的  $\alpha$  粒子照射细胞的实验表明,细胞核接受单个或数个  $\alpha$  粒子照射,可引起已知的基因突变,突变率大于千分之三,且突变率与注入粒子数呈正相关<sup>[15]</sup>。据调查,美国因肺癌死亡的人群中,每年约有 15000 人可能是因为居室内氡气衰变形成的  $\alpha$  粒子入射引起的。支气管上皮细胞是  $\alpha$  粒子的靶细胞,每年每人会受到 1 至 10 几个  $\alpha$  粒子的照射,这就是为什么一些无抽烟史的人也容易患肺癌的原因<sup>[16]</sup>。进一步的研究结果显示:粒子注入细胞质也有诱变效应,其诱变机理与自由基的产生有关,粒子注入对细胞通信和细胞 pH 值的影响可能是致变的重要原因。总

之,阐明单粒子引起细胞恶性转化的机理,探讨环境低剂量辐射对人类健康的影响,对于提高人们的生存质量,分析太空辐射对人体的危险性都具有重要意义,这是一个立足现实、有广泛应用前景的研究课题。

## 5 展望

离子束生物工程从应用至今虽然仅短短 10 余年的时间,但已成为许多国家竞相开展的国际前沿课题。这项技术的发展,不仅促进了核科学的发展,而且将促进生命科学研究的变革,有着广泛的应用前景。正如专家们所预示的那样,离子束在生命科学中的应用研究,如同离子束在材料科学中的应用一样,正处在重大突破的前夜。

由于用于辐照的离子束的参数除了能量可调外,离子种类、电荷、质量皆可调,因此,其可操作性好,在不久的将来,可以用微束对细胞进行超微加工,有目的地切割染色体用于基因工程和细胞工程。

在离子束与生物体相互作用过程中,粒子的植入、动量的传递和电荷交换可导致细胞表面被刻蚀,引起细胞膜透性和跨膜电场改变。据此原理,可发展离子束诱导细胞融合技术。另外,由于离子束的可操纵性高,可以通过消除部分染色体或染色体的某些片段达到细胞非对称融合的目的。此项研究一旦成功,将改变传统的一对一细胞融合的弊端,减少供体细胞导入的染色体范围,使融合更具目的性,大大减少筛选的工作量,将是细胞融合研究的一大进步。

和其他事物一样,离子束生物工程装置中也存在一些有待进一步解决的问题。由于注入过程需要在真空条件下进行,这虽然对处于休眠状态下的成熟种子或微生物孢子影响不大,而由于真空造成的低温常会对活体组织造成损伤,这就使对以活体组织为材料的研究工作受到制约。中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程研究室正在安装的由美国 Texas 大学赠送的 5.5 MV 高能注入机,将使这一问题

得到解决。高能注入机将束流引出,操作在常压下进行,对于活体组织特别是活体植株的操作就会十分方便。但是,现有加速器对细胞的“加工”定位精度还不够,若将离子束聚焦到微米以下,控制离子的射程,瞄准特定部位,就可以对细胞进行三维精确操纵(步长可达  $0.2\mu\text{m}$ ),从而用于定点遗传操作及对叶绿体、线粒体等细胞器实施手术。为了解决这个问题,该研究室即将安装单离子加速器。当然,这项技术也不是一蹴而就的,制约其发展的不仅有物理因素,而且也有一些急待解决的生物技术问题,如活体细胞无损染色技术、细胞无抽固定和拆除,特别是细胞图像的重演较为困难。但总起来说,离子束生物工程是一门很有发展前途的技术,相信在生物学家和物理学家的共同努力下,这一领域的发展前景将会更广阔。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Huang Weidong, Yu Zenglian, Wang Xiangqin *et al.* *Radiat. Phys. Chem.*, 1996, 48(3) : 319—323
- [ 2 ] 宋道军,余增亮. *科学(中译本)*, 1996, (11) : 49—52
- [ 3 ] 杨垂绪(美),梅曼彤(中). *太空放射生物学*. 广州:中山大学出版社, 1995, 34, 57
- [ 4 ] Sedlak B J, *Genetic Eng. News*, 1995, (1) : 8
- [ 5 ] 陈佳洱. *核技术*. 北京:科学出版社, 1991, 140, 156
- [ 6 ] 江泽慧,彭镇华. *安徽农业大学学报*, 1994, 21(3) : 295—298
- [ 7 ] 崔海瑞,吴兰佩,余增亮等. *安徽农业大学学报*, 1994, 21(3) : 303—305
- [ 8 ] Potrykus I, *Annul. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 1991, 42 : 205—225
- [ 9 ] 杨剑波,吴李君,吴家道等. *科学通报*, 1994, 39(16) : 1530—1534
- [ 10 ] 杨剑波,吴跃进,吴李君等. *安徽农业大学学报*, 1994, 21(3) : 330—335
- [ 11 ] 程备久,田秋元,李展等. *核农学报*, 1996, 10(3) : 150—154
- [ 12 ] 余增亮. *物理*, 1997, 26(6) : 333—338
- [ 13 ] Wang Xiangqin, Han Jianwei, Shao Chunlin *et al.* *Viva Origino*, 1998, 26(2) : 109—115
- [ 14 ] 杜海彪,邱冠英,杜严华. *生物物理学报*, 1997, 13(2) : 261—265
- [ 15 ] Hei T K, Wu Lijun, Liu Suxian *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1997, 94(4) : 3765—3770
- [ 16 ] J. B. Little, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1997, 94(6) : 5996—5997