

· 应用研究 ·

低能 Ar^+ 注入家蚕卵的生物学效应研究

徐家萍^{1,2}, 吴跃进^{1*}, 刘雪兰¹, 袁航¹, 余增亮¹

(1. 中国科学院等离子体物理研究所离子束生物重点实验室, 安徽合肥 230031;
2. 安徽农业大学生命科学学院, 安徽合肥 230036)

摘要:家蚕作为鳞翅目昆虫的模式生物,是研究遗传和变异的极好模型。本文以家蚕卵为材料,研究不同能量和剂量的低能 Ar^+ 注入家蚕卵的生物学效应,结果表明:在真空 10 min 时间内,对家蚕卵的孵化无明显影响;在 25 keV 和 30 keV 的能量下, $2.6 \sim 8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 的剂量作用于家蚕卵,对家蚕卵的孵化影响较为显著;在能量为 30 keV, 剂量为 $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 和 $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 的 Ar^+ 轰击下,以扫描电镜可观察到蚕卵壳表面有明显的刻蚀痕迹;并且经 30 keV, $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 处理的饲养区至 5 龄期发现了 3 例突变性状。

关键词:低能 Ar^+ ; 家蚕卵; 刻蚀效果; 孵化率; 突变

中图分类号: Q631

文献标识码: A

文章编号: 1007-7146(2009)02-0236-05

Effects Induced by Low-energy Ar Ion Irradiation in Silkworm, *Bombyx mori*

XU Jia-ping^{1,2}, WU Yue-jin^{1*}, LIU Xue-lan², YUAN Hang¹, YU Zeng-liang¹

(1. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 233031, Anhui, China; 2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: With its genome sequenced, *Bombyx mori* (silkworm), the type species of Lepidoptera, has been proved to be an excellent experimental system for studying genetics and mutation. In this study, low energy Ar^+ ions with different energies and fluences were used to bombard silkworm eggs so as to explore resulting biological effects. Results showed that (i) while exposure of silkworm eggs to vacuum within 10 min had no significant impact on hatching rates, bombardment of silkworm eggs by 25 keV or 30 keV Ar^+ ions with fluences ranging from $2.6 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² to $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² had significant impact on hatching rates; (ii) bombardment of silkworm eggs by 30 keV Ar^+ ions with a fluence of $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² or $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² resulted in noticeable etching on egg shell surface which could be observed by scanning electron microscope; and (iii) bombardment of silkworm eggs by 30 keV Ar^+ ions with a fluence of $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² generated three types of mutant phenotypes which were observed in the 5th instar silkworms.

Key words: low-energy Ar ion; silkworm eggs; etching effect; hatch value; mutation

收稿日期: 2008-07-15; 修回日期: 2008-11-20

基金项目: 中国博士后基金项目(20060390702); 安徽省自然科学基金项目(070411017)

作者简介: 徐家萍(1968—), 女, 安徽天长人, 研究员, 博士, 生物物理学专业博士后。研究方向: 离子束生物工程。
(电话)0551-5786360; (电子信箱)jiapingxu@163.com

* 通讯作者: (电子信箱)yjwu@ipp.ac.cn

低能离子在自然界和宇宙空间广泛存在,它们于生物的进化、星际分子的形成以及人类的健康都有着密切的关系,所谓高能离子诱导的生物效应实际上是一系列低能事件的综合结果^[1]。离子束生物技术自20世纪90年代兴起以来,已经广泛用于植物育种,微生物育种以及外源基因转移等^[2,4],虽然在细菌、哺乳动物细胞和线虫方面也取得了一些进展^[5-7],但由于受离子注入时真空环境的限制,在动物方面的研究就显得较为滞后。为拓展离子束生物技术应用范围,更好的评价环境低能粒子对于生物的相互作用,本研究已经完成基因组测序的鳞翅目昆虫家蚕作为材料,研究低能 Ar⁺作用的生物学效应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用非滞育的多化性家蚕品种大造卵为试验材料。家蚕的饲养:从春季到秋季以桑叶饲育,冬季全龄人工饲料,饲育温度25℃,产卵后25℃保护至甲胚子期供离子束注入。注入后的蚕卵25℃保存催青至孵化,调查三日孵化率。

1.2 注入处理

样品放入靶室进行 Ar⁺注入,注入能量分别为

25 keV,30 keV,剂量分别为 $6 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $7 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $10 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm²,每个剂量设3个重复。

1.3 真空处理

样品放入加盖培养皿中,在进行 Ar⁺注入同时进行,实际样品只进行了真空处理。每次各剂量设3个重复。

1.4 离子注入机相关参数

本研究使用的低能离子束生物工程装置是本研究室专门用于低能离子束处理生物材料的装置,包含一个气体离子源,垂直束线,2个靶室,以及电源和控制系统,见图1可引出氢、氮、氦和氩等气体离子,能量5 keV~50 keV连续可调,离子流强10 nA~100 nA。离子注入前注入机预热1小时40 min,大靶室真空度为 $(3.5 \sim 5.0) \times 10^{-2}$ Pa,大小靶室的隔离打开以后,小靶室真空度达到 3.4×10^{-2} Pa 的时间为10 s~40 s。

2 结果与讨论

2.1 真空对蚕卵孵化率的影响

真空对蚕卵孵化率的影响见图2。

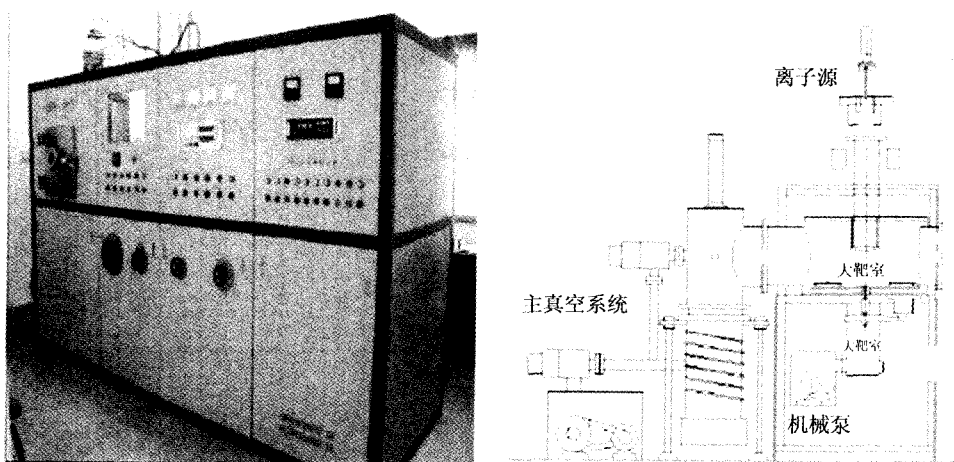


图1 IBBe-Device装置(左)及其示意图(右)

Fig. 1 The IBBe-Device(left) and schematic diagram(right)

由图2可见,与ck相比,在真空暴露2 min时有一个稍微明显的降低,到13 min时有一个明显的减弱。根据两两t测验的结果:只有40 s和2 min之间存在差异,其他差异均不显著,说明在 3.4×10^{-2} Pa

的真空条件对蚕卵的孵化没有显著影响。离子束生物技术之所以在植物中应用比较成功,而在动物中的研究较少报道,就是因为动物很难克服真空的压力。家蚕卵能够克服真空损伤的原因可能由于家蚕

卵具有比较坚硬的蛋白质外壳能够保护内部胚胎不受损伤。本研究结果为家蚕卵作为离子束研究的材料奠定了基础。

2.2 低能 Ar 离子注入对家蚕卵孵化的影响

在 25 keV, 30 keV, 剂量分别为: $6 \times 2.6 \times 10^{15}$

ion/cm^2 , $7 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$, $8 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$, $9 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$, $10 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$ 注入剂量的情况下, 调查家蚕卵 3 日孵化率, 以 Originpro6.0 软件进行数据分析, 结果如图 3 所示。

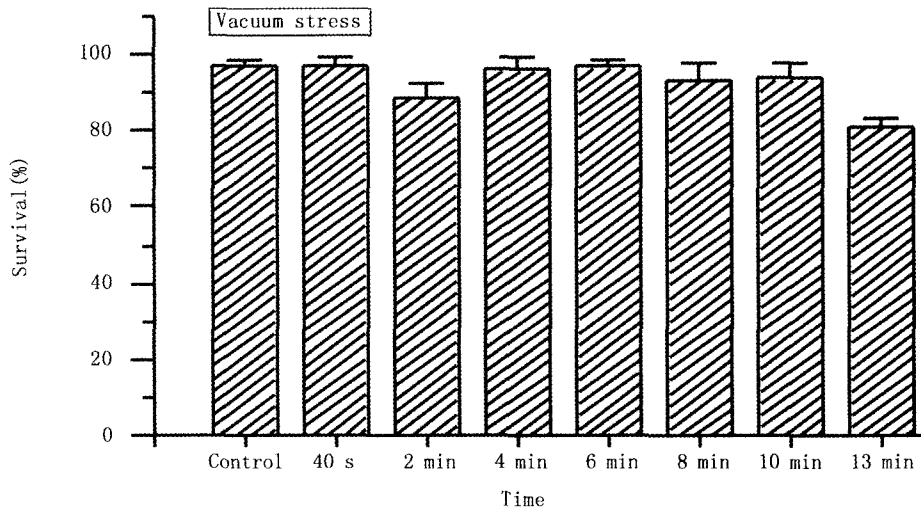


图2 真空暴露对家蚕卵孵化的影响

Fig.2 Survival of silkworm eggs in different times in vacuum exposure

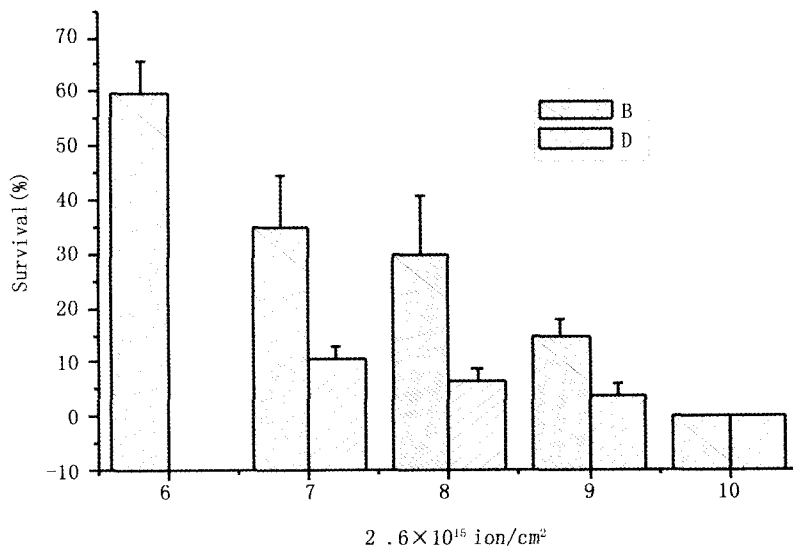


图3 Ar^+ 注入对家蚕卵孵化的影响

Fig.3 The effects of low energy argon ion implantation on survival of silkworm egg

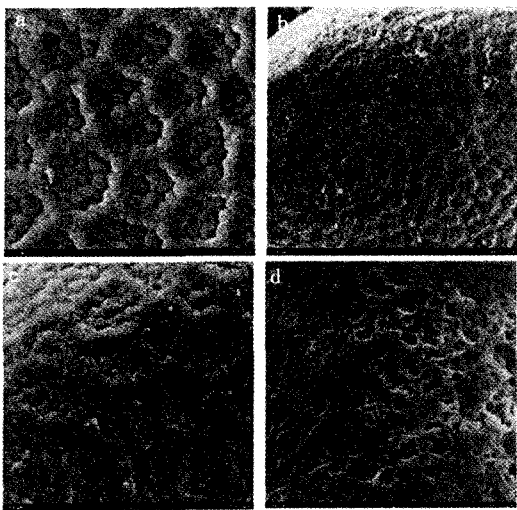
由图 3 可见, 在 25 keV 的能量下, 给予 $6 \times 2.6 \times 10^{15} \sim 8 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$ 离子的剂量作用于家蚕卵, 对家蚕卵的孵化影响差异较为显著, $8 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$ 剂量的作用下, 孵化率只有 14 % 左右,

而在 30 keV 能量下, 给予 $7 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$ 的剂量作用于家蚕卵, 其孵化率就已经降为 10 % 左右, 而剂量增加到 $10 \times 2.6 \times 10^{15} \text{ ion}/\text{cm}^2$ 时孵化率均为 0, 说明家蚕卵能够承受的最大剂量为 $9 \times 2.6 \times 10^{15}$

ion/cm²。

2.3 低能 Ar 离子对家蚕卵表面的刻蚀效果

家蚕卵是多孔的片层状结构如图 5 (g),以能量为 30 keV,剂量为 $6 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm², $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 和 $10 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 注入家蚕卵,以扫描电镜观察到蚕卵壳表面的刻蚀情况如图 4。



a: ck; b: 30 keV, $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm²; c: 30 keV, $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm²; d: 30 keV, $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm²

Surface damage was detected by SEM. Picture a (ck) of silkworm egg under vacuum-exposure only or after ion bombardment (b, c, d) are presented. Bar is 0.062 mm in a, c and (d), and 0.195 mm in b.

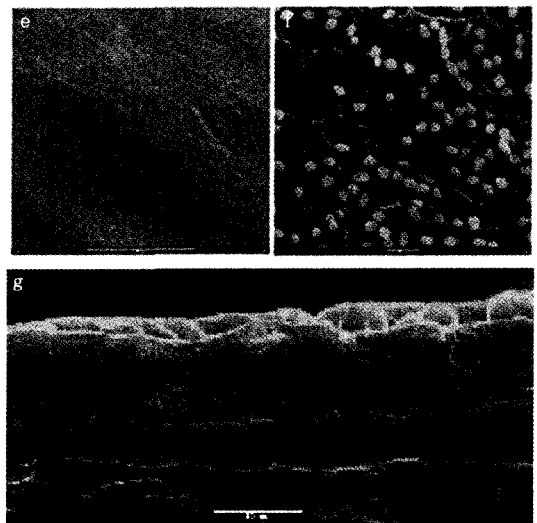
图 4 低能 Ar⁺注入对家蚕卵壳表面的刻蚀效应

Fig. 4 Etching effects of keV Ar⁺ on the surface of silkworm egg shell

由图 4 可见,在注入能量为 30 keV,注入剂量为 $8 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 和 $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 的 Ar⁺ 轰击下,家蚕卵壳表面受到明显的刻蚀痕迹,而且在 $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 剂量条件下刻蚀更为明显。

为了检测离子束刻蚀对卵壳结构的影响,我们以扫描电镜观察了蚕卵壳的内壁,如图 5。由图 5 可以看出,在受到 30 keV, $10 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 轰击后,家蚕卵壳的内表面和真空对照相比出现较大的差异,内表面出现很多的凹陷和孔洞,并且有很多的白色附着物,这些白色附着物可能为死亡的胚胎的残留。至于孔洞是否为低能离子束刻蚀的结果尚待

进一步研究。



e: 真空对照; f: 30 keV, $10 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 处理后的卵壳内表面; g: 正常卵壳的横切面

e: ck; f: 30 keV, $10 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² (Surface damage was detected by SEM. Bar is 0.01 mm in e and f.)

图 5 低能 Ar⁺注入家蚕卵后卵内表面的效应

Fig. 5 Etching effects of keV Ar⁺ on the inner surface of silkworm egg shell.

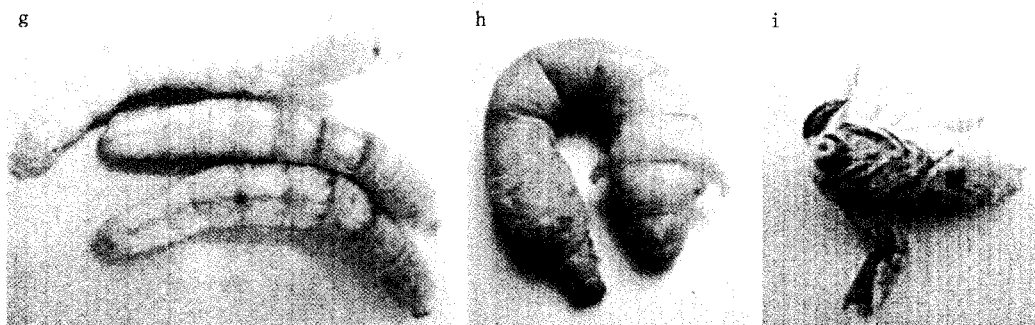
2.4 低能 Ar 离子对家蚕的诱变效果

所有注入后的蚕卵孵化的蚁蚕在常规条件下分区饲养,五龄后期在 30 keV, $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 处理区发现了几例原来品种不具有的特殊性状。初步确定为 Ar⁺ 注入引起的突变性状。g 图为油蚕突变性状, h 图可见蚕儿的第 6 环节的腹足向外突起; 而 i 图中的蚕蛾个体触角缺失同时单侧的翅畸形。

图 g 为油蚕突变,油蚕突变在家蚕诱变中较为常见,也是家蚕诱变最为常见的一种。但该突变的个体之间杂交繁育后, F₁ 代和 F₂ 代却未能表现油蚕性状,可见该性状并未遗传。图 h 为环节突变类型,该环节突变的个体发蛾后不能交配产卵而死,该突变性状未见有过报道。图 i 为一侧触角缺失同时一侧翅异常,翅异常蚕蛾也较常见,但一侧触角和翅异常同时发生未见有报道,该个体不能交配和产卵。很遗憾这几个突变均未能有遗传的后代。其发生的机理有待进一步研究。

3 讨论

低能离子广泛存在于自然界,影响着生物体的进化和健康,低能离子对于固体材料,植物的辐射诱



g: 油蚕突变; h: 环节突变; i: 触角缺失和翅异常

图6 低能 Ar^+ 注入家蚕卵引发的诱变效应

Fig.6 Mutation of silkworm by low energy argon ion implantation

变及植物遗传物质转移的研究已经较为深入, 探明低能离子对细胞乃至动物有机体的影响机理的研究正在逐步进行。

在离子束生物效应发现的初期, 研究者即观察到 20 keV ~ 30 keV Ar^+ 和 N^+ 对植物材料表面的刻蚀现象。基本特征包括: 所有面向离子束的细胞壁都有一定程度的减薄, 刻蚀严重的情况下有较深的孔和沟道出现, 甚至被完全剥离暴露出内部的创伤面; 溅射产物不仅有单原子和简单分子, 也包括大的生物分子和细胞碎片; 溅射减薄的尺度在 100 nm ~ 200 nm, 远远高于理论模拟计算值 6 nm^[8-9]。离子束刻蚀植物细胞壁表面的一个显著特征是损伤程度和损伤结构分布的非均匀性^[10]。S Sangyuenyongpipat 等观察到经多种气体和金属离子, 如 Mg, Xe, Ar, 和 Cl, 刻蚀的细胞壁表面出现分布不均匀的微弹坑结构, 且随离子剂量增加弹坑的密度也增加^[11-12]。说明这些微弹坑的形成确实是离子束轰击的结果, 而真空失水或仅仅入射粒子能量的沉积并不能引起同等性质和程度的损伤。本研究以家蚕卵作为低能离子束作用的对象研究观察到了低能离子束对卵壳具有明显的刻蚀效应, 形成了微弹坑的结构。

陆挺等通过正电子湮灭证明, 100 keV 的 N^+ 对植物种胚的影响深度大约为 200 μm , 同时在植物种子的疏松结构中存在许多体积为 0.06 nm 的空洞, 因此 30 keV ~ 200 keV 的 N^+ 能够穿过种皮, 引起种子胚部的变化^[13]。本研究从刻蚀后的卵壳的内表面也发现了很多的孔洞, 由图 5 (g) 可见家蚕的卵壳的厚度只有 10 μm ~ 11 μm 的厚度, 离子束通过刻蚀和离子通道的作用穿透卵壳是完全可能的, 但是否是离子束真正的穿透了家蚕的卵壳尚有待进一步研究。低能离子束对生物体的突变发生作用在植物,

微生物领域已经有很多报道。C X Xie 等利用利福平抗性突变 (Rifr) 筛选体系, 筛选低能离子辐照后大肠杆菌利福平抗性突变子并对突变子的 $rpoB$ 进行了测序分析, 并与 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线辐照后的突变谱进行了比较^[14], 在相同的细胞存活水平 (50 % 存活率), 10 keV 的 N^+ 离子束诱发的 Rifr 突变率 (9.5×10^{-7}) 是 $^{60}\text{Co}-\gamma$ 射线 (9.3×10^{-8}) 的十倍左右。本研究发现在 30 keV, $9 \times 2.6 \times 10^{15}$ ion/cm² 作用后的家蚕群体饲养中发现了的几个变异个体, 表明低能离子束作用家蚕卵后的确可以诱发家蚕个体的突变。

自上世纪 80 年代中期, 余增亮等首次发现了 30 keV 的 N^+ 注入水稻的诱变效应, 并提出低能离子与生物体相互作用原初过程的能量沉积、质量沉积、电荷转移“三因子”假说。随着研究的深入低能离子与有机体相互作用的物理化学基础、离子注入生物效应和离子束遗传改良在农业和工业发酵领域的应用成果^[2], 本研究对于低能离子束作用家蚕卵引起的一系列生物学效应的发现与探索为低能离子束在动物领域的研究奠定了基础。

References

- [1] MICHAEL B D, NEILL P O. A Sting in the Tail of Electron Tracks[J]. Science, 2000, 287: 1603-1604.
- [2] YU Z L. Introduction to Ion Beam Biotechnology [M]. New York: Springer, 2005.
- [3] 杨剑波, 吴李君, 吴家道, 等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株[J]. 科学通报, 1994, 39(16): 1530-1534. YANG Jian-bo, WU Li-jun, WU Jia-dao, et al. Study on Rice Transformation Mediated by Low Energy Ion Beam Implantation [J]. Chin Sci Bull, 1994, 39(16): 1530-1534.
- [4] YU Z L, YANG J B, WU Y J. Transferring GUS Gene into Intact Rice Cells by Low Energy Ion Beam [J]. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 1993, 81: 1328-1331. (下转第 177 页)

- trol Chromaffin Cell Cortical F-Actin Dynamics during Exocytosis[J]. *Biochimie*, 2000, 82(4):339-352.
- [17] TRIFARO J M, LEJEN T, ROSE S D, et al. Pathways that Control Cortical F-Actin Dynamics during Secretion[J]. *Neurochem Res*, 2002, 27(11): 1371-1385.
- [18] JESAITIS A J, BOKOCH G M, TOLLEY J O, et al. Lateral Segregation of Neutrophil Chemotactic Receptors into Actin-and Fodrin-Rich Plasma Membrane Microdomains Depleted in Guanylnucleotide Regulatory Proteins[J]. *J Cell Biol*, 1988, 107(3):921-928.
- [19] JESAITIS A J, TOLLEY J O, BOKOCH G M, et al. Regulation of Chemoattractant Receptor Interaction with Transducing Proteins by Organizational Control in the Plasma Membrane of Human Neutrophils[J]. *J Cell Biol*, 1989, 109(6 Pt 1):2783-2790.
- [20] SAHARAN, SIRAGANIAN R P, OLIVER C. Morphological Changes Induced by the Calcium Ionophore A23187 in Rat Basophilic Leukemia (2H3) Cells[J]. *J Histochem Cytochem*, 1990, 38(7):975-983.
- [21] OLIVER C, SAHARA N, KITANI S, et al. Binding of Monoclonal Antibody AA4 to Gangliosides on Rat Basophilic Leukemia Cells Produces Changes Similar to those Seen with Fc Epsilon Receptor Activation[J]. *J Cell Biol*, 1992, 116(3):635-646.
- [22] GUZMÁN R E, BOLAÑOS P, DELGADO A, et al. Depolymerisation and Rearrangement of Actin Filaments during Exocytosis in Rat Peritoneal Mast Cell: Involvement of Ryanodine-Sensitive Calcium Stores[J]. *Pflugers Arch*, 2007, 454(1): 131-141.
- [23] COKE H. Serum Anti-Trypsin in Chronic Rheumatic Disease [J]. *Ann Rheum Dis*, 1949, 8(2):135-138.
- [24] HAGERMARK D, RAJKA G, BERQVIST U. Experimental Itch in Human Skin Elicited by Rat Mast Cell Chymase [J]. *Acta Derm Venereol*, 1972, 52(2):125-128.
- [25] MILLER J S, SCHWARTZ L B. Human Mast Cell Proteases and Mast Cell Heterogeneity[J]. *Curr Opin Immunol*, 1989, 1(4):637-642.
- [26] IRANI A M, BUTRUS S I, TABBARA K F, et al. Human Conjunctival Mast Cells: Distribution of MCT and MCTC in Vernal Conjunctivitis and Giant Papillary Conjunctivitis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1990, 86(1):34-40.
- [27] WEIDNER N, AUSTEN K F. Ultrastructural and Immunohistochemical Characterization of Normal Mast Cells at Multiple Body Sites[J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 96(3):26S-30S; discussion 30S-31S.

(上接第240页)

- [5] YU Z L. Ion Beam Application in Genetic Modification [J]. *IEEE Trans Plasma Sci*, 2000, 28:128-135.
- [6] FENG H Y, WU L J, YU L X, et al. Mutagenic Effect of a keV Range N⁺ Beam on Mammalian Cells [J]. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 2005, 234:477-486.
- [7] FENG H Y, WU L J, XU A, et al. Survival of Mammalian Cells under High Vacuum Condition for Ion Bombardment [J]. *Cryobiology*, 2004, 49: 241-249.
- [8] LIU X L, CAI K Z, FENG H Y, et al. Effects Induced by keV Low-energy Ion Irradiation in the Nematode *Caenorhabditis Elegans* [J]. *Radiat Environ Biophys*, 2007, 46:255-261.
- [9] YU Z L, YANG Y, WU B, et al. Transferring Gus Gene into Intact Rice Cells by Low Energy Ion Beam [J]. *Nucl Instrum Methods B*, 1993, 80-81:1328.
- [10] YU L D, PHANCHAISRI B, APAVATJIRUT P, et al. Some Investigations of Ion Bombardment Effects on Plant Cell Wall Surfaces [J]. *Surf Coat Technol*, 2002, 158-159:146-150.
- [11] SANGYUENYONGPIPAT S, VILAITHONG T, YU L D, et al. Metal Ion Bombardment of Onion Skin Cell Wall [J]. *Nucl Instrum Meth B*, 2005, 227: 289-298.
- [12] SANGYUENYONGPIPAT S, YU L D, VILAITHONG T. Ion Bombardment Induced Formation of Micro-craters in Plant Cell Envelops [J]. *Nucl Instrum Meth B*, 2006, 242:8-11.
- [13] 陆挺. 离子注入植物引起生物效应的机理 [J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 1996, 32(2): 227-229.
LU Ting. The Mechanism of Biological Effect Caused by Ion Implantation [J]. *Journal of Beijing Normal University (Natural Sciences)*, 1996, 32(2): 227-229.
- [14] XIE C X, XU A, WU L J, et al. Comparison of Base Substitutions in Response to Nitrogen Ion Implantation and ⁶⁰Co-gamma Ray Irradiation in *Escherichia coli* [J]. *Genet Mol Biol*, 2004, 27: 284-290.