

低温等离子体灭活核糖核酸酶研究

江敏^{1,2} 王菲² 易志健² 喻学锋² 黄逸凡^{1,2} 周文华² 朱剑豪^{1,2}

¹(深圳市中科摩方科技有限公司 深圳 518114)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 生物医药与技术研究所 深圳 518055)

摘要 该文主要探讨了低温等离子体技术在核糖核酸酶灭活方面的应用,分析了作用气体类型和等离子体发生器结构对酶灭活性能的影响。实验结果表明,低温等离子体能够有效地灭活核糖核酸酶,混有氧气或水汽的作用气体能够明显提高对酶的灭活能力,且悬浮式电极介质阻挡放电装置的灭活效果优于表面介质阻挡放电装置。

关键词 低温等离子体;核糖核酸酶;灭活

中图分类号 O 539 文献标志码 A

A Study on Inactivation of Ribonuclease by Nonthermal Plasma

JIANG Min^{1,2} WANG Fei² YI Zhijian² YU Xuefeng² HUANG Yifan^{1,2}

ZHOU Wenhua² Paul K. CHU^{1,2}

¹(China Morefound Technology Ltd., Shenzhen 518114, China)

²(Institute of Biomedicine and Biotechnology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract In this study, the application of nonthermal plasma technology in the inactivation of ribonuclease was discussed, and the influence of acting gas and plasma generator on the inactivation performance was analyzed. The experimental results show that ribonuclease can be inactivated effectively by nonthermal plasma. Moreover, the inactivation performance will be obviously improved by mixing oxygen or water into the acting gas. Also, compared with surface dielectric barrier discharge plasma, the inactivation performance of ribonuclease is better by using floating-electrode dielectric barrier discharge generator.

Keywords nonthermal plasma; ribonuclease; inactivation

收稿日期: 2018-04-07 修回日期: 2018-05-16

基金项目: 深圳市海外高层次人才孔雀团队项目(KQTD2016030111500545); 广东省引进领军人才项目(00201520)

作者简介: 江敏, 硕士, 助理工程师, 研究方向为等离子体技术; 王菲, 硕士, 研究方向为等离子体技术和模拟计算; 易志健, 本科, 研究方向为等离子体技术; 喻学锋, 研究员, 博士生导师, 研究方向为二维材料和等离子体技术; 黄逸凡(通讯作者), 研究员, 博士生导师, 研究方向为等离子体技术, E-mail: yf.huang@siat.ac.cn; 周文华(通讯作者), 博士, 研究方向为生物学, E-mail: wh.zhou@siat.ac.cn; 朱剑豪, 讲席教授, 研究方向为等离子体技术。

1 引 言

核糖核酸酶(Ribonuclease, RNase)广泛存在于各种环境中, 在人和动物的唾液、汗液和血液中均可常见。它是由数个半胱氨酸基组成一类结构紧凑、体积较小的蛋白质。其中, 半胱氨酸基之间采用二硫键连接形成^[1], 这种结构方式使得变性的核糖核酸酶容易在室温下恢复原有的结构, 难以被灭活。同时, 核糖核酸酶具有很强的生物学活性, 容易使核糖核酸(Ribonucleic Acid, RNA)分解, 对实验结果造成干扰, 尤其是 RNA 提取实验。如何有效去除核糖核酸酶污染已成为实验室污染亟待解决的一个难题。目前, 去除核糖核酸酶的常用方法有: 焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶液浸泡^[1]、高温高压灭菌和 RNase 抑制剂。然而, 焦碳酸二乙酯是高活性烷化试剂, 对人体有害且存在致癌风险; 高温高压灭菌和 RNase 抑制剂不能使核糖核酸酶完全灭活。

低温等离子体因其含有大量高能电子、自由基和激发态原子等活性粒子, 备受关注与研究。大量研究表明低温等离子体能够有效破坏蛋白质结构。Segat 等^[2]利用低温等离子体对乳清分离蛋白溶液进行处理, 发现作用 15 min 后, 蛋白质全部发生了氧化。Kim^[3]研究了氦气/氧气低温等离子体处理生物分子效应, 发现活性氧自由基对细胞内多肽、DNA 和酶蛋白具有损伤作用。Deng 等^[4]利用激光诱导技术从放电电压、氧气流量等方面研究氦气/氧气等离子体灭活蛋白的机制。Jijie 等^[5]以牛血清蛋白为模型研究了氦等离子体射流对蛋白结构的影响。Takai 等^[6]以溶菌酶为蛋白模型研究了等离子体对蛋白功能的影响。Topala 和 Nagatsu^[7]用氦等离子体射流处理牛血清蛋白和游离蛋氨酸发现它们极易被等离子体氧化。Lackmann 等^[8]用蛋白和 DNA 模型来研究污水中等离子体灭菌的机

理。陈绪松等^[9]利用蛋白含量测定和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术分析经等离子体射流处理过的牛血清蛋白, 结果推测等离子体产生的活性成份可使牛血清蛋白变性或断裂成片段。Lackmann 等^[10]以牛血清蛋白为模型研究, 从拉曼光谱测得的等离子体射流能够氧化酪氨酸残基和含硫氨基酸, 但半胱氨酸没有明显的氧化现象。Lackmann 等^[11]利用双介质阻挡放电(Dielectric Barrier Discharge, DBD)装置产生的氦气/氧气等离子体射流对 RNase 进行处理, 实验结果表明其对 RNase 具有显著的灭活效果。然而, 等离子体灭活效果受到作用气体类型和发生器结构等因素的影响, 目前尚不清楚其他作用气体类型对 RNase 的灭活效果, 且 DBD 射流因结构的限制, 在实际应用中难以实现大面积、高效的灭活效果。

针对上述存在的问题, 本文主要探讨低温等离子体技术在核糖核酸酶灭活的应用, 并分析了等离子体活性粒子密度的两个关键影响因素(作用气体类型和等离子体发生器结构)对核糖核酸酶灭活效果的影响。旨在确定等离子体灭活核糖核酸酶最佳作用气体类型和发生器结构, 为等离子体技术在实验室污染处理领域应用推广提供参考依据。

2 实验方法

2.1 实验装置

本文主要采用了双介质阻挡放电装置、悬浮电极式介质阻挡放电(Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge, FE-DBD)装置和表面介质阻挡放电(Surface Dielectric Barrier Discharge, SDBD)装置对核糖核酸酶进行灭活研究: 前者用于探讨不同作用气体对核糖核酸酶活性的影响; 后两者(可大面积处理的等离子体发生器)用于探讨等离

子体发生器结构对核糖核酸酶活性的影响。文中所涉及的放电装置如图 1 所示。其中, 双介质阻挡放电装置的高压电极为直径 2 mm 的铜棒, 内介质为内径 2 mm、外径 4 mm 的石英管, 外介质为 2 mL 的石英针筒。悬浮电极式介质阻挡放电装置则采用直径为 30 mm、厚度为 0.5 mm 的圆形铜板作为高压电极, 并将其置于外径为 35 mm 的聚四氟乙烯中。而表面介质阻挡放电装置则采用厚度为 2 mm 的陶瓷片作为阻挡介质, 厚度为 0.2 mm 的铜片作为正负极并粘附在陶瓷片两侧, 形成导体-阻挡介质-导体结构。在本文中, 采用南京苏曼的 CTP-2000K 低温等离子体实验电源, 放电电压检测采用 Tektronix P6015A 高压探头, 示波器采用 Tektronix TBS1102。

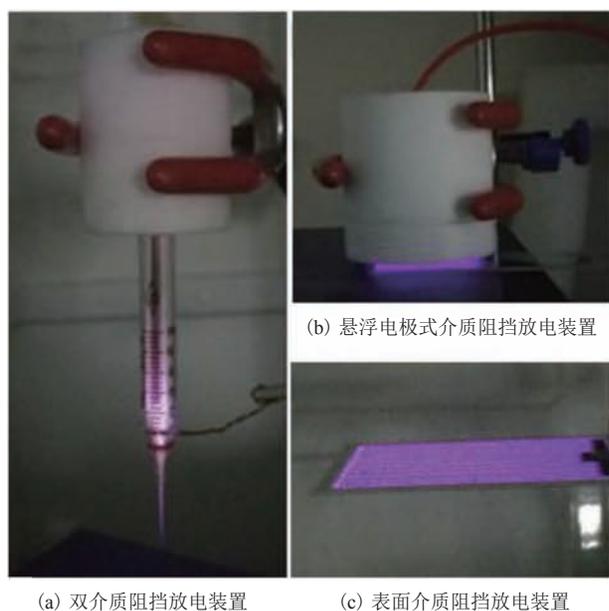


图 1 低温等离子体装置示意图

Fig. 1 Schematic of cold temperature plasma generators

2.2 作用气体

作用气体对放电电压、等离子体成份种类及密度等具有关键的影响作用。在本文中, 双介质阻挡放电装置采用的作用气体氩气 (Ar)、氦气 (He) 和氧气 (O₂) 均为高纯度气体, 纯度为 99.99%。而惰性气体/水汽的混合气体则是利用惰性气体 (氩气或氦气) 通入水溶液而获得。悬浮

式电极介质阻挡放电装置和表面介质阻挡放电装置则直接采用空气作为作用气体。

2.3 核糖核酸酶类型

核糖核酸酶类型繁多, 本研究主要以稳定性强、最难灭活的核糖核酸酶 A 作为处理对象。核糖核酸酶 A 来源于牛胰腺, 属于核糖核酸内切酶, 由 124 个氨基酸残基和 4 对分子内的二硫化键组成。本实验中的核糖核酸酶 A 购自 Sangon Biotech 公司的 B500474 核糖核酸酶 A 溶液, 浓度为 10 mg/mL。

2.4 荧光探针

本文采用荧光法来检测核糖核酸酶的活性。选用的荧光试剂为 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA, 是一种实验室常用的 RNase 探针, 化学结构如图 2 所示^[12], 发射波长为 490 nm, 激发波长为 520 nm。当其与核糖核酸酶混合时, P1 基团上的 P—O 键容易被酶剪切断裂成 6-FAM (6-羧基荧光素) 和 6-TAMRA (6-羧基四甲基罗丹明)。酶的活性越强, P—O 键被剪切速度越快, 产物 6-FAM 含量越多, 荧光强度上升的

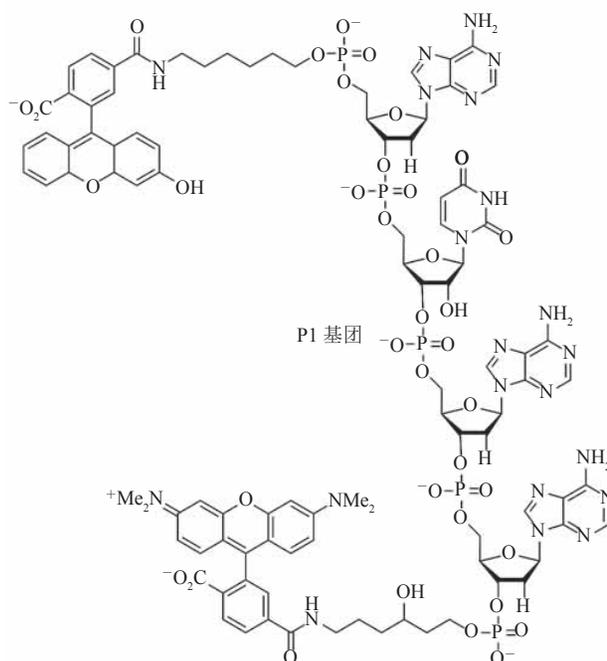


图 2 荧光试剂的化学结构^[12]

Fig. 2 Chemical structure of fluorescent reagents^[12]

速率则越快。因此, 通过荧光强度变化速率可以判断核糖核酸酶的活性。

2.5 实验步骤

(1) 将 10 mg/mL 的核糖核酸酶 A 溶液分散在 pH 7.5 的 Tris·HCl/NaCl 缓冲溶液中稀释制得待处理溶液。其中, 利用双介质阻挡放电装置处理的待处理溶液浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 利用悬浮电极式介质阻挡放电装置和表面介质阻挡放电装置处理的待处理溶液浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 取 30 μL 浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的待处理液放置于 200 μL 离心管中, 取 10 μL 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的待处理液放置于经灭菌无酶的 2 cm \times 2 cm 盖玻片中干燥待用。

(3) 将上述 (2) 中含 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 核糖核酸酶 A 溶液的离心管移至双介质阻挡放电装置喷嘴下方, 调整液面与喷嘴的距离为 15 mm, 设置放电电压为 12 kV, 按设定时间进行处理。

(4) 取上述 (2) 中含有核糖核酸酶 A 溶液的盖玻片放置于无菌玻璃片上, 调整悬浮电极式介质阻挡放电装置放电面与盖玻片的距离为 3 mm, 设置放电电压为 12 kV。按设定时间处理后将盖玻片放置于含有 10 mL pH 7.5 的 Tris·HCl/NaCl 缓冲溶液的离心管进行浸泡, 使盖玻片上的核糖核酸酶 A 溶液充分分散在缓冲液中。

(5) 取上述 (2) 中含有核糖核酸酶 A 溶液的盖玻片并用夹子夹持, 调整表面介质阻挡放电装置放电面与盖玻片的距离为 1 mm, 设置放电电压为 12 kV。按设定时间处理后将盖玻片放置于含有 10 mL pH 7.5 的 Tris·HCl/NaCl 缓冲溶液的离心管进行浸泡, 使盖玻片上的核糖核酸酶 A 溶液充分分散在缓冲液中。

(6) 取 20 μL 上述 (3)、(4) 和 (5) 中的核糖核酸酶 A 溶液, 将其加到 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA 荧光探针中, 使用日立 F-4600 荧光分光光度计测得荧光强度, 以此判断核糖核酸酶 A 的活性。

3 结果与讨论

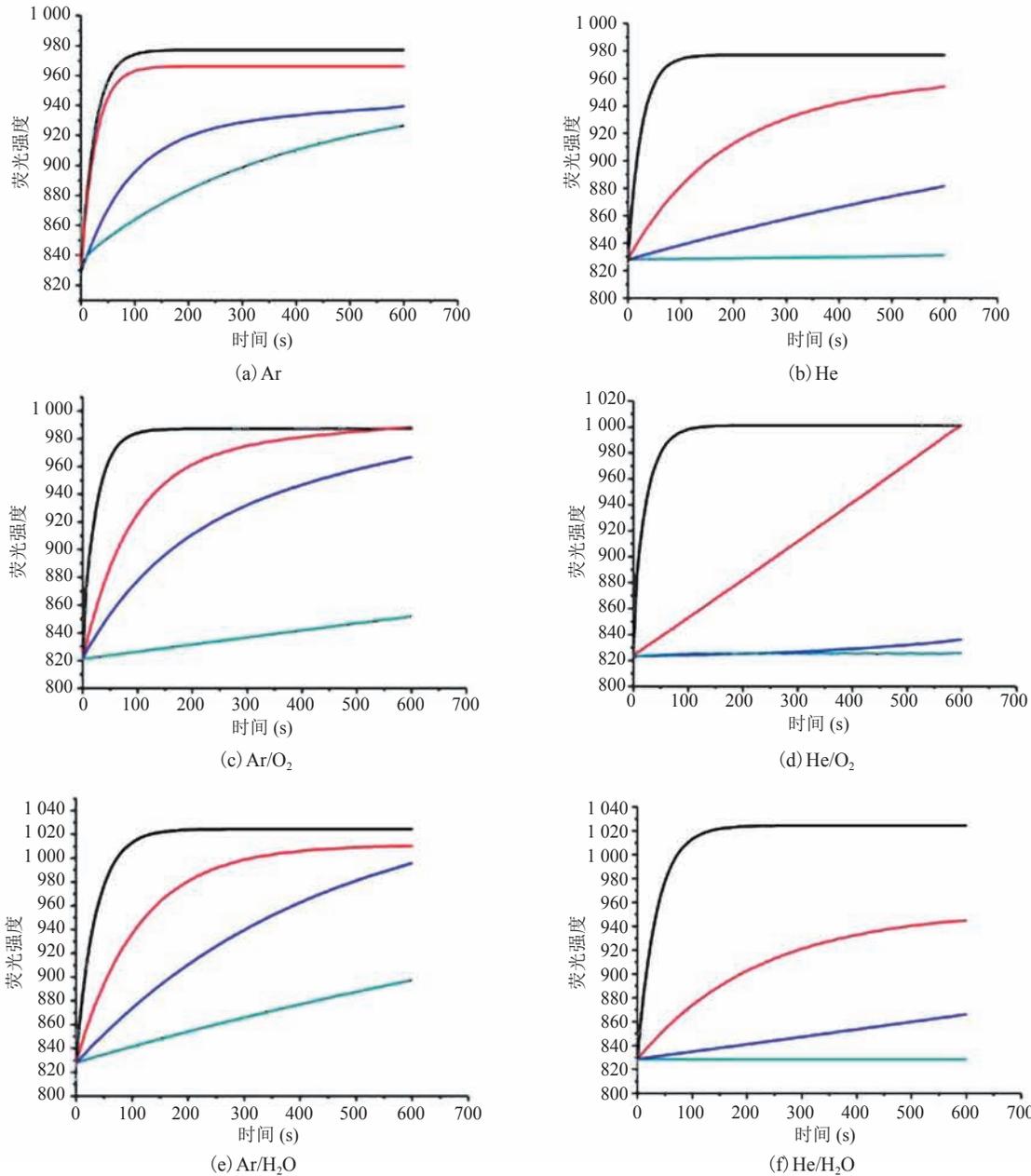
3.1 作用气体类型对核糖核酸酶 A 活性的影响

低温等离子体中含有大量的自由基、活性基团、带电粒子等, 能够有效地破坏核糖核酸酶的二硫化键结构, 使得酶蛋白发生变性引起失活^[11]。低温等离子体处理核糖核酸酶的效率主要取决于自由基、活性粒子等成份的浓度。

由图 3 可以看出, 双介质阻挡放电装置产生的等离子体射流对核糖核酸酶 A 溶液具有明显的灭活作用。从荧光强度上升的速率可以看出, 处理时间为 1 min 时, 核糖核酸酶 A 出现失活或活性降低现象。随着作用时间的增加, 荧光强度上升速率呈逐渐降低趋势, 这是由于随着作用时间的增加, 大量的酶已经失活或活性降低, 导致其剪切荧光探针上 P—O 键的效率也降低。对比图 3(a)、(c)、(e) 和 (b)、(d)、(f) 可以得出, 作用气体中含氦气产生的等离子体灭活核糖核酸酶 A 的效果优于含氩气, 作用 5 min 基本可完全灭活。这是由于氦气放电初始电压低于氩气, 在相同的放电电压下, 氦气等离子体产生的活性粒子密度比较高。此外, 由图 3 还可以看出, 作用气体中混有氧气或者水汽的灭活效果优于单一惰性气体。这是因为相对作用单一惰性气体而言, 作用气体中含有氧气或水汽, 产生的等离子体中含有较高浓度的活性氧粒子、羟基等功能团, 能够更高效地破坏核糖核酸酶 A 结构上的 4 对二硫化键, 导致蛋白质结构的破损, 从而使其失活。

3.2 等离子体发生器结构对核糖核酸酶 A 活性的影响

低温等离子体的成份种类及浓度不仅受到作用气体类型的影响, 同时也会受到发生器结构的限制。考虑实际应用的需求, 本文探讨了两种可实现大面积处理的悬浮电极式介质阻挡放电装置 (FE-DBD) 和表面介质阻挡放电装置 (SDBD) 对核糖核酸酶 A 灭活的影响。



注: — 对照组; — 1 min; — 3 min; — 5 min; 氩气(Ar)、氦气(He)的流量均为 2 L/min; 氧气(O₂)的流量为 0.06 L/min

图3 不同作用气体产生的低温等离子体处理核糖核酸酶 A 的荧光强度图

Fig. 3 Fluorescence intensity of treated RNase A by different acting gas plasma

由图 4 可以看出, FE-DBD 和 SDBD 两种等离子体发生器结构对核糖核酸酶 A 均具有明显的灭活作用。FE-DBD 等离子体结构产生的等离子体处理 3 min 后, 测得荧光强度没有明显的变化, 说明核糖核酸酶 A 已经失活; 而 SDBD 等离子体结构则需要处理 5 min。在相同放电电压和

作用时间条件下, FE-DBD 结构产生的等离子体灭活核糖核酸酶 A 的效果优于 SDBD 结构。

4 与国内外相似研究对比分析

核糖核酸酶性质稳定, 耐热、耐酸、耐碱,

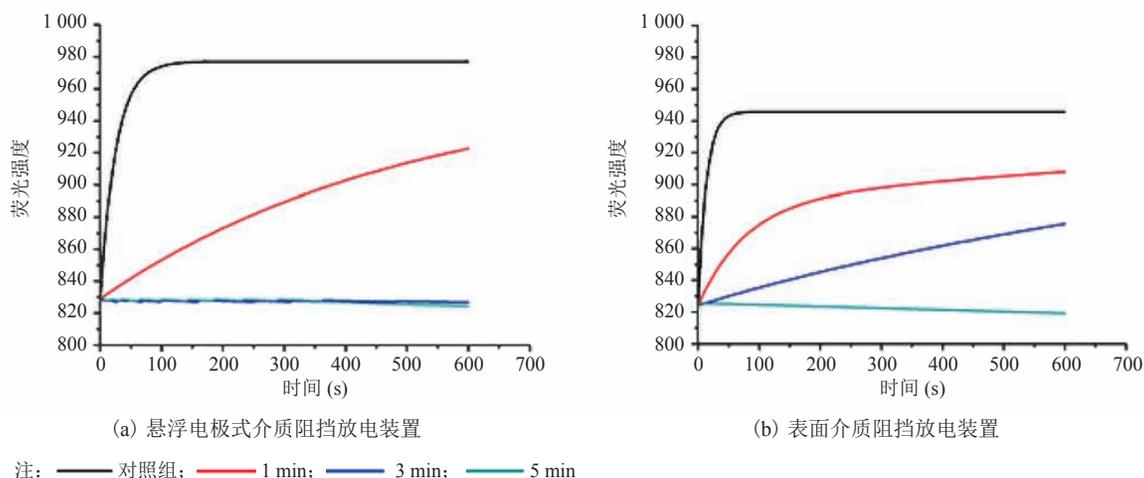


图 4 不同等离子体发生器结构处理核糖核酸酶 A 的荧光强度

Fig. 4 Fluorescence intensity of treated RNase A by different plasma generator

且具有强的生物学活性, 很容易使 RNA 分解, 这不仅容易造成实验室生物污染, 同时在一定程度上限制了分子生物技术——聚合酶链式反应 (PCR) 技术的发展。然而针对核糖核酸酶去除的研究比较少。曹文俊等^[13]利用焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水溶液浸泡去除样品的核糖核酸酶。熊毅等^[14]利用氧钒核糖核苷复合物 (RVC) 抑制核糖核酸酶的活性, 发现浓度为 10 mmol/L 的 RVC 可以抑制 40 μg 核糖核酸酶。而 Lackmann 等^[11]利用 DBD 等离子体对核糖核酸酶进行灭活作用, 结果表明, 等离子体对核糖核酸酶水溶液作用 30 s 后活性降低 50% 以上, 作用 300 s 后酶基本失活。对比现有研究, 本文主要对大气压低温等离子体灭活核糖核酸酶的影响参数展开研究, 分析了作用气体类型和等离子体发生器结构对核糖核酸酶 A 灭活的影响。实验结果表明, 混有氧气或水汽的作用气体灭活效果优于单一惰性气体, 且 FE-DBD 等离子体发生器结构灭活效果较佳, 作用 3 min 即可完全灭活核糖核酸酶 A。

5 结论与展望

本文主要从作用气体类型和发生器结构两个

方面研究了大气压低温等离子体对核糖核酸酶 A 灭活的影响。结果表明, 大气压低温等离子体能够有效灭活核糖核酸酶 A, 且作用气体类型和发生器结构对灭活效果起着重要影响作用。作用气体中混有氧气或水汽能够明显增强核糖核酸酶 A 的灭活能力。相对于 SDBD 等离子体发生器, FE-DBD 等离子体发生器产生的等离子体对核糖核酸酶 A 的灭活效果更佳。

核糖核酸酶污染是目前实验室洁净面临的重要挑战之一, 虽然已有相关研究证明等离子体技术能够有效地灭活核糖核酸酶, 但主要是针对酶溶液处理。如何将等离子体技术切实应用到实验室酶污染体灭活是后续推广重点考虑的方向, 如酶污染枪头、酶污染实验台等灭活, 等离子体大面积灭活酶相关仪器的开发和设计等。

参 考 文 献

- [1] 张国庆, 叶冬青. RNA 分析中的核糖核酸酶控制 [J]. 现代预学, 2004, 31(2): 202-203.
- [2] Segat A, Misra NN, Cullen PJ, et al. Atmospheric pressure cold plasma treatment of whey protein isolate model solution [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2015, 29: 247-254.

- [3] Kim SM, Kim JI. Decomposition of biological macromolecules by plasma generated with helium and oxygen [J]. *Journal of Microbiology*, 2006, 44(4): 466-471.
- [4] Deng XT, Shi JJ, Kong MG. Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: capability and mechanisms [J]. *Journal of Applied Physics*, 2007, 101(7): 1075-1083.
- [5] Jijie R, Pohoata V, Topala I, et al. Thermal behavior of bovine serum albumin after exposure to barrier discharge helium plasma jet [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 101(14): 425-454.
- [6] Takai E, Kitano K, Kuwabara J, et al. Protein inactivation by low-temperature atmospheric pressure plasma in aqueous solution [J]. *Plasma Processes & Polymers*, 2012, 9(1): 77-82.
- [7] Topala I, Nagatsu M. Capillary plasma jet: a low volume plasma source for life science applications [J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 106(5): 291-229.
- [8] Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, et al. Photons and particles emitted from cold atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2013, 10(89): 20130591.
- [9] 陈绪松, 李栋, 刘志杰, 等. 等离子体射流灭活液体中铜绿假单胞菌的研究 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 865-871.
- [10] Lackmann JW, Edengeiser E, Schneider S, et al. Effects of the effluent of a microscale atmospheric pressure plasma-jet operated with He/O₂ gas on bovine serum albumin [J]. *Plasma Medicine*, 2013, 3(1-2): 115-124.
- [11] Lackmann JW, Baldus S, Steinborn E, et al. A dielectric barrier discharge terminally inactivates RNase A by oxidizing sulfur-containing amino acids and breaking structural disulfide bonds [J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015, 48(49): 494003.
- [12] Kelemen BR, Klink TA, Behlke MA, et al. Hypersensitive substrate for ribonucleases [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(18): 3696-3701.
- [13] 曹文俊, 郑岚, 黄宇闻, 等. 血浆丙型肝炎病毒核酸稳定性的研究 [J]. *诊断学理论与实践*, 2003, 2(3): 206-211.
- [14] 熊毅, 朱伟, 刘棋, 等. 样品中的 RNA 酶去除试验研究 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(3): 93-95.