

• 环境生物技术 •

聚苯乙烯纳米塑料-植物蛋白冠的形成与特征

孟凡松, 喻燕妮, 张秋歌, 赵常悦, 杨雯雯, 栾亚宁*, 戴伟*

北京林业大学林学院 森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083

孟凡松, 喻燕妮, 张秋歌, 赵常悦, 杨雯雯, 栾亚宁, 戴伟. 聚苯乙烯纳米塑料-植物蛋白冠的形成与特征[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1188-1201.

MENG Fansong, YU Yanni, ZHANG Qiuge, ZHAO Changyue, YANG Wenwen, LUAN Yaning, DAI Wei. Formation and characteristics of polystyrene nanoplastic-plant protein corona[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1188-1201.

摘要: 为探究聚苯乙烯纳米塑料-植物蛋白冠的形成过程以及蛋白冠的形成对植物可能造成的影响, 本研究选用 3 种平均粒径为 200 nm 不同表面修饰的聚苯乙烯纳米塑料微球和新几内亚凤仙 (*Impatiens hawkeri*) 为对象, 将 3 种聚苯乙烯纳米塑料分别与新几内亚凤仙的叶蛋白提取物进行反应, 反应时间分别为 2、4、8、16、24、36 h。利用扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)观察其形貌变化, 原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)进行表面粗糙度测定, 使用纳米粒度和 zeta 电位分析仪测定水合粒径及 zeta 电位, 液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)鉴定蛋白冠的蛋白成分。从生物学过程、细胞组分以及分子功能 3 个方面对蛋白进行分类, 研究不同表面修饰的纳米塑料对蛋白的吸附选择, 探究聚苯乙烯纳米塑料-植物蛋白冠的形成与特征, 预测蛋白冠对植物造成的可能影响。结果表明: 随着反应时间增加, 纳米塑料的形貌变化越发明显, 表现为尺寸和粗糙度的增加和稳定性的增强, 由此证明了蛋白冠的形成; 在相同蛋白浓度条件下, 3 种聚苯乙烯纳米塑料与叶蛋白形成蛋白冠的过程中, 由软蛋白冠到硬蛋白冠的转化速度基本一致; 在与叶蛋白进行反应时, 3 种纳米塑料对不同等电点和分子量蛋白的吸附选择存在差异, 最终形成的蛋白冠的粒径和稳定性也存在差异, 氨基修饰纳米塑料对蛋白质的吸附能力更强, 形成的硬蛋白冠的稳定性强于羧基修饰纳米塑料和无修饰纳米塑料; 由于蛋白冠的蛋白组分中很大一部分参与植物的光合作用, 由此推测, 蛋白冠的形成可能对新几内亚凤仙的光合作用产生影响。

关键词: 聚苯乙烯纳米塑料; 新几内亚凤仙; 叶蛋白; 蛋白冠; 液相色谱-串联质谱

资助项目: 中央高校基本科研业务费(2021ZY14); 国家自然科学基金(32001197)

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China (2021ZY14), and the National Natural Science Foundation of China (32001197).

*Corresponding authors. E-mail: LUAN Yaning, luanyaning@bjfu.edu.cn; DAI Wei, daiwei1@bjfu.edu.cn

Received: 2022-09-21; Accepted: 2023-01-08; Published online: 2023-01-13

Formation and characteristics of polystyrene nanoplastic-plant protein corona

MENG Fansong, YU Yanni, ZHANG Qiuge, ZHAO Changyue, YANG Wenwen, LUAN Yaning*, DAI Wei*

The Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: To investigate the formation of polystyrene nanoplastic-plant protein corona and its potential impact on plants, three differently modified polystyrene nanoplastics with an average particle size of 200 nm were taken to interact with the leaf proteins of *Impatiens hawkeri* for 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, and 36 h, respectively. The morphological changes were observed by scanning electron microscopy (SEM), the surface roughness was determined by atomic force microscopy (AFM), the hydrated particle size and zeta potential were determined by nanoparticle size and zeta potential analyzer, and the protein composition of the protein corona was identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The proteins were classified in terms of biological processes, cellular components, and molecular functions to study the adsorption selection of nanoplastics to proteins, investigate the formation and characteristics of polystyrene nanoplastic-plant protein corona and predict the potential impact of protein corona on plants. The results showed that the morphological changes of the nanoplastics became clearer as the reaction time extends, as evidenced by the increase in size and roughness and the enhancement of stability, thus demonstrating the formation of protein corona. In addition, the transformation rate from soft to hard protein corona was basically the same for the three polystyrene nanoplastics in the formation of protein corona with leaf proteins under the same protein concentration conditions. Moreover, in the reaction with leaf proteins, the selective adsorption of the three nanoplastics to proteins with different isoelectric points and molecular weights differed, and the particle size and stability of the final formed protein corona also differed. Since a large portion of the protein fraction in protein corona is involved in photosynthesis, it is hypothesized that the formation of the protein corona may affect photosynthesis in *I. hawkeri*.

Keywords: polystyrene nanoplastics; *Impatiens hawkeri*; leaf proteins; protein corona; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

据统计,全球生产的塑料约 79%被填埋或遗弃在自然界中^[1],它们在热、光和化学等作用下会逐渐光降解或破碎形成微塑料(microplastic,尺寸小于 5 mm),甚至是纳米塑料(nanoplastics,尺寸小于 1 μm)^[2]。由于较大的比表面积和高表面能等性质,纳米塑料很容易和生物大分子结合形成“蛋

白冠”,改变其自身的结构、动力学行为和功能。蛋白冠的形成或许能够解释当前对纳米塑料植物毒性评价的矛盾之处:一方面,纳米塑料本身的团聚或与植物体内关键蛋白的相互作用会导致纳米材料的生物毒性水平增加^[3];另一方面,纳米塑料周围包裹的蛋白冠可能会改变细胞的摄取机

制,导致其生物毒性水平降低^[4]。因此,明确纳米塑料蛋白冠对植物毒性和生物大分子生理功能发挥的影响具有十分重要的生态学意义。

研究表明,纳米颗粒可以穿过细胞层结构进入生物体^[5-6]。纳米塑料可以在细胞壁之间的微观细胞外通道中移动,进入和利用负责水转运的脉管系统,迅速转移到茎、叶甚至果实中^[7]。例如,李连祯等^[8]的研究证明粒径 200 nm 的聚苯乙烯微球可以被生菜的根部大量吸收并富集,然后从根部移动到生菜的茎叶部位。在针对人^[9]、动物^[10]和植物,如芥菜^[11]开展的相关研究中进一步发现,植物细胞可通过两个阶段完成对纳米塑料的吸收,首先,细胞膜对纳米塑料进行吸附,然后通过能量依赖或非能量依赖途径将其内化^[12]。蛋白冠会影响纳米颗粒在生物体内的分布、积累^[13-14]、降解^[15]、清除、细胞内识别^[16]、信号传导和毒性等^[17-18],也会通过影响生物大分子的功能表达,改变其生理生化作用的发挥^[19]。

理论上,纳米塑料可以和植物蛋白形成蛋白冠。但迄今由于此类研究很少,导致纳米塑料与植物蛋白质结合能否形成蛋白冠、蛋白冠对植物蛋白质和纳米塑料的影响等一系列相关科学问题仍不清晰。这对于深入理解和分析纳米塑料的生态风险是非常不利的。因此,本研究选用环境中最常见的聚苯乙烯纳米塑料和新几内亚凤仙的叶蛋白作为塑料模型和蛋白模型,通过体外实验,明确不同表面修饰(无修饰、氨基修饰和羧基修饰)的纳米塑料与叶蛋白形成蛋白冠的可能性,探究蛋白冠的形成转化特征和性质,为深入探讨纳米塑料与植物体内蛋白的相互作用及其作用产物对纳米塑料的毒性影响提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

植物材料:将长势一致且无病虫害的新几内

亚凤仙成株置于恒温光照培养箱中培养。培养条件:光照-黑暗周期为 12 h,光照时段的光照强度和温度为 3 000 lx 和 23 °C,黑暗时段的温度为 18 °C;空气湿度为 85%。培养后用于叶蛋白质提取。

纳米塑料:3 种标示粒径为 200 nm (实际粒径以实验表征结果为准)、不同表面修饰的聚苯乙烯纳米塑料均购自天津大鹅科技有限公司。表面修饰分别为带正电的氨基聚苯乙烯微球、带负电的羧基聚苯乙烯微球和不带电的无表面修饰聚苯乙烯微球。

1.2 实验方法

1.2.1 植物叶蛋白的提取

利用提取试剂盒(上海贝博生物科技有限公司)提取植物总蛋白。将 500 mg 洗净擦干后的鲜嫩叶组织置于研钵中,加入液氮充分研磨后加入 500 μL 提取液。将研磨后的液体转移至预冷的干净离心管中,在 4 °C 条件下振荡 30 min。振荡后的离心管放入离心机,在 4 °C、12 000×g 条件下离心 15 min。上清液转移至另一预冷的干净离心管,得到蛋白提取液。

1.2.2 蛋白提取液的配制

采用考马斯亮蓝法测定蛋白提取液中叶蛋白浓度,使用超纯水将提取液中的叶蛋白浓度稀释至 0.1 mg/mL。

1.2.3 蛋白冠的制备

使用超纯水将 3 种纳米塑料配制成浓度为 1 mg/mL 的分散液,分别与浓度为 0.1 mg/mL 的叶蛋白提取液等体积混匀。每次吸取 2 mL 分别于 25 °C、400 r/min 摇床上培养 2、4、8、16、24 h 和 36 h。培养结束后,在 10 000×g 条件下离心 20 min。将沉淀转移到干净的离心管中,加入超纯水后反复搅拌,15 000×g 离心 30 min,重复 3 次后收集沉淀,得到纳米塑料-蛋白复合物。

1.2.4 蛋白冠的表观形貌分析

将纳米塑料-蛋白复合物和纳米塑料样品置于不同离心管中,离心管口用纱布封闭固定后放入超低温冰箱(Sanyo 公司, MDF-U53V)预冷 2 h。取出后的离心管放入真空冷冻干燥机(Labconco 公司, FreeZone 4.5 L)中冷冻干燥 24 h。取少量样品,用离子溅射镀膜仪在样品表面镀膜,然后利用场发射电子扫描显微镜(Hitachi Limited 公司, SU8010)测定各样品的形貌特征,获取照片。

1.2.5 蛋白冠的粒径和粗糙度分析

将少量干燥样品置于制样片上,用原子力显微镜(Bruker 公司, Multimode 8)观察样品的粒径和粗糙度。在每个样品结果图中随机选取 10 个样点,利用 NanoScope Analysis 1.5 软件测定纳米塑料及纳米塑料-蛋白复合物的粗糙度。

1.2.6 蛋白冠的水合粒径和 zeta 电位分析

用超纯水将纳米塑料和纳米塑料-蛋白复合物配制成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的均匀溶液,利用纳米粒度仪和 zeta 电位分析仪(Malvern 公司, Zetasizer Nano ZS90)测定各样品的水合粒径和 zeta 电位。

1.2.7 蛋白质的组成分析

将反应 36 h 后各处理的纳米塑料-蛋白复合物样品分别加入 300 mL 的 1 \times SDS 上样缓冲液中,使用移液枪吹打摇匀。沸水浴中加热 10 min 后,12 000 $\times g$ 离心 20 min。将上清液转入干净的离心管中,得到纳米塑料表面吸附的蛋白溶液样品。

采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析纳米塑料-植物蛋白冠的表面蛋白组成。首先对溶液样本进行 SDS-PAGE,切取相应胶条后脱色,取真空冷冻干燥后的粉末样本,与加载缓冲液(1 \times)混合,用移液器反复吹打,沸水浴加热 10 min。10 000 $\times g$ 离心 20 min,将上清液转移至 1.5 mL EP 管中备用。将样品和 marker 加入 12%分离

凝胶的孔中,电压 80 V 运行 15 min 后,再将电压调节至 120 V 运行 15 min。结束后卸下胶板,剥离胶放入考马斯亮蓝染色液中,室温染色 1 h。加入脱色液,置于 80 r/min 脱色摇床上,每 20 min 更换一次脱色液至完全脱净。然后,对脱色后的胶粒进行胰蛋白酶(trypsin)酶解处理,使用毛细管高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司)对样品液进行液相色谱分离,利用电喷雾-组合型离子阱 Orbitrap 质谱仪(Thermo Fisher Scientific 公司)分析蛋白质的组成。质谱原始文件使用 MaxQuant (1.6.2.10)软件分别检索目标蛋白数据库得到蛋白鉴定结果,并使用 BLAST 2 GO 软件对蛋白进行基因本体论(gene ontology, GO)功能注释分析,同时分析每个处理蛋白冠组分的功能分类及代谢通路。

1.2.8 数据处理及分析

以上所有实验均进行 3 次平行实验,相关数据均利用 Excel 软件进行数据处理,利用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,数据采用平均值 \pm 标准误差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 纳米塑料-植物蛋白复合物的表观形貌

3 种不同表面修饰的纳米塑料表面均表现为表面平滑、大小均一、排列紧密但无粘连或团聚现象(图 1A、1B、1C)。反应 4 h 后,纳米塑料的表面出现了不规则的凸起,改变了其原有的平滑特征,部分纳米塑料颗粒之间出现了较为明显粘连或团聚现象(图 2A、2B、2C);反应 8 h 后,纳米塑料的表观形貌产生进一步变化,表面吸附现象更为明显,而且发现,纳米塑料颗粒间明显存在一层物质,该层物质似乎引发纳米塑料之间互相粘连并产生团聚现象(图 2D、2E、2F)。反应 36 h 后,纳米塑料的表观形貌出现很大变化,颗粒明显变大且更不均匀,纳米塑料颗粒间的粘连和团聚现象更为明显(图 2G、2H、2I)。

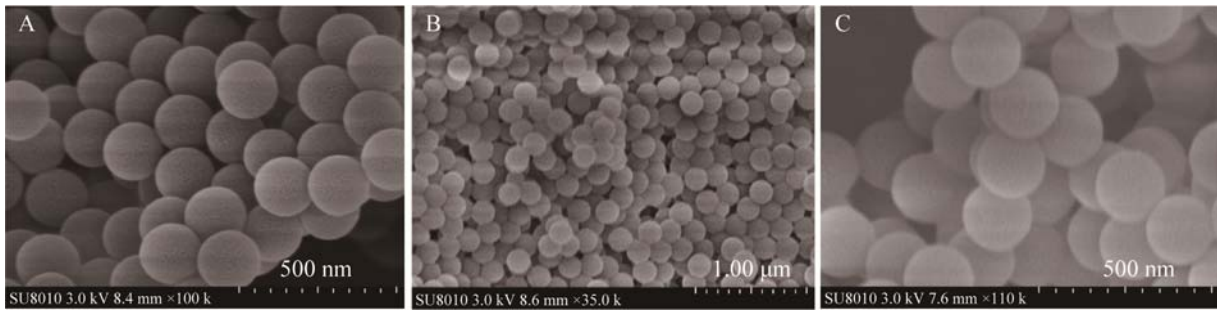


图1 纳米塑料的扫描电镜成像 A: 氨基修饰纳米塑料. B: 羧基修饰纳米塑料. C: 无修饰纳米塑料
Figure 1 Scanning electron microscopy of nanoplastics. A: Amino-modified nanoplastics. B: Carboxyl-modified nanoplastics. C: Unmodified nanoplastics.

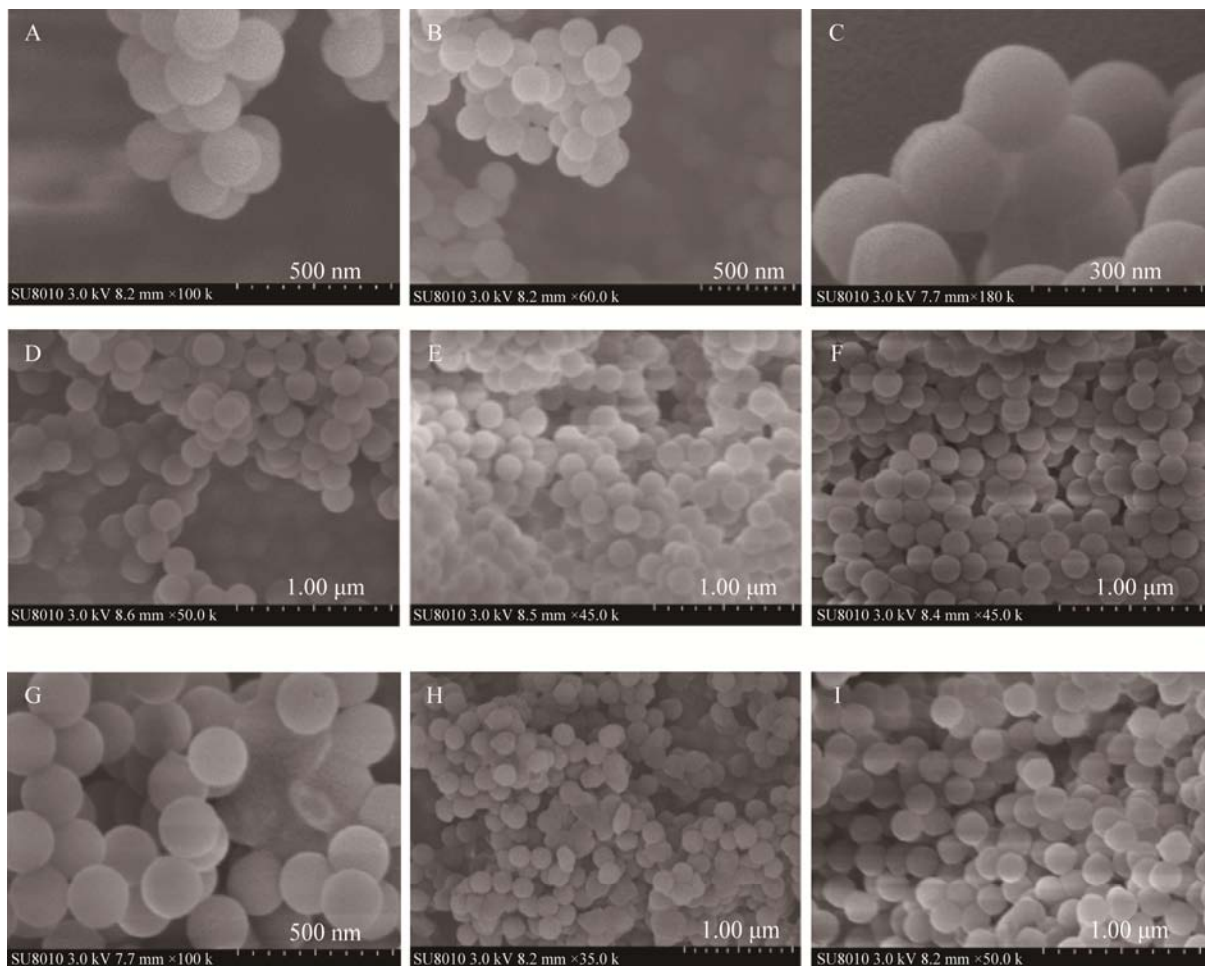


图2 相互作用后的纳米塑料-叶蛋白复合物的扫描电镜成像 第一组(A、B和C)、第二组(D、E和F)和第三组(G、H和I)分别为反应4 h、8 h和36 h后的氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物、羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物和无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物

Figure 2 Scanning electron microscopy of nanoplastics-leaf protein complexes after interaction. Group 1 (A, B, and C), group 2 (D, E, and F), and group 3 (G, H, and I) represent amino-modified nanoplastics-leaf protein complexes, carboxyl-modified nanoplastics-leaf protein complexes, and unmodified nanoplastics-leaf protein complexes after 4 h, 8 h, and 36 h of reaction, respectively.

2.2 纳米塑料-植物蛋白复合物的形貌和粗糙度

三种纳米塑料样品的粒径较为均一,粗糙度较小。但与植物叶蛋白混合反应后发现,随着反应时间的增加,纳米塑料的形貌变化更加明显并

且粗糙度表现出增大特征。

2.2.1 纳米塑料的形貌和粗糙度

原子力表征结果如图 3 所示。氨基修饰纳米塑料的粗糙度主要集中在 10–20 nm 之间(90%),羧基修饰纳米塑料的粗糙度主要集中在 10–20 nm

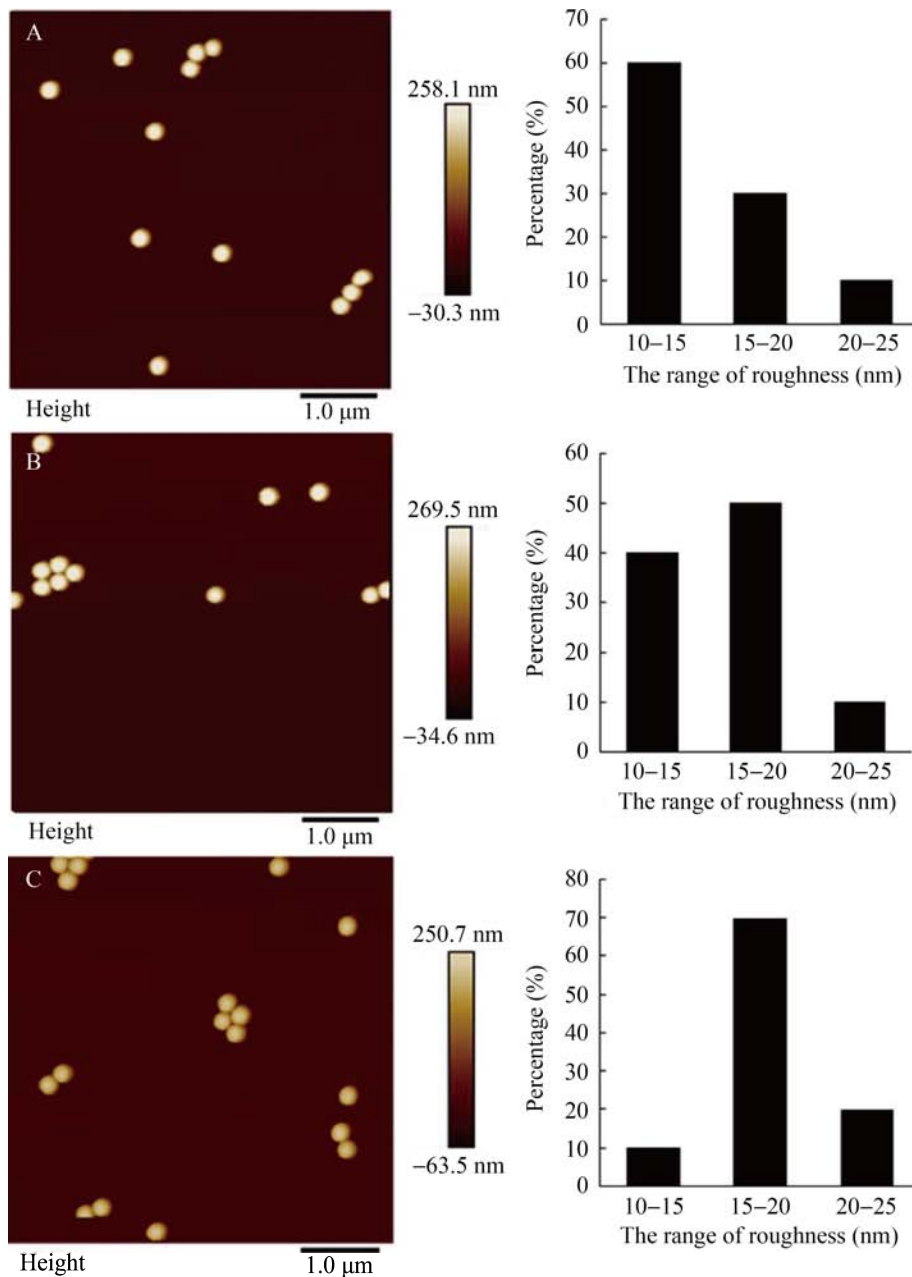


图 3 纳米塑料的原子力显微镜成像及表面粗糙度分布 A: 氨基修饰纳米塑料. B: 羧基修饰纳米塑料. C: 无修饰纳米塑料

Figure 3 Atomic force microscopy imaging and surface roughness distribution of nanoplastics. A: Amino-modified nanoplastics. B: Carboxyl-modified nanoplastics. C: Unmodified nanoplastics.

之间(90%)，无修饰纳米塑料粗糙度主要集中在15–20 nm 之间(70%)。3 种纳米塑料的颗粒大小较为均一，并且粗糙度较小。

2.2.2 纳米塑料-叶蛋白复合物的粒径和粗糙度

纳米塑料与叶蛋白反应4 h 后，90%的氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在20–30 nm 之间；90%的羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在20–30 nm 之间，90%的无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在20–30 nm 之间。对比2.2.1 结果发现，3 种纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度均升高10–15 nm (图4A、4B、4C)。

反应8 h 后，60%的氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在25–30 nm 之间，80%的

羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在25–35 nm 之间，90%的无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度分布范围在25–35 nm 之间。与反应4 h 后的结果比较发现，在反应4–8 h 时间段内，3 种纳米塑料-叶蛋白复合物的粗糙度有0–10 nm 左右的升幅(图4D、4E、4F)。

反应36 h 后，80%的氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在40–50 nm 之间，90%的羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在40–50 nm 之间；90%的无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物粗糙度集中在40–50 nm 之间。在反应8–36 h 时间内，3 种纳米塑料-叶蛋白复合物的粗糙度进一步增加，升幅为10–15 nm (图4G、4H、4I)。

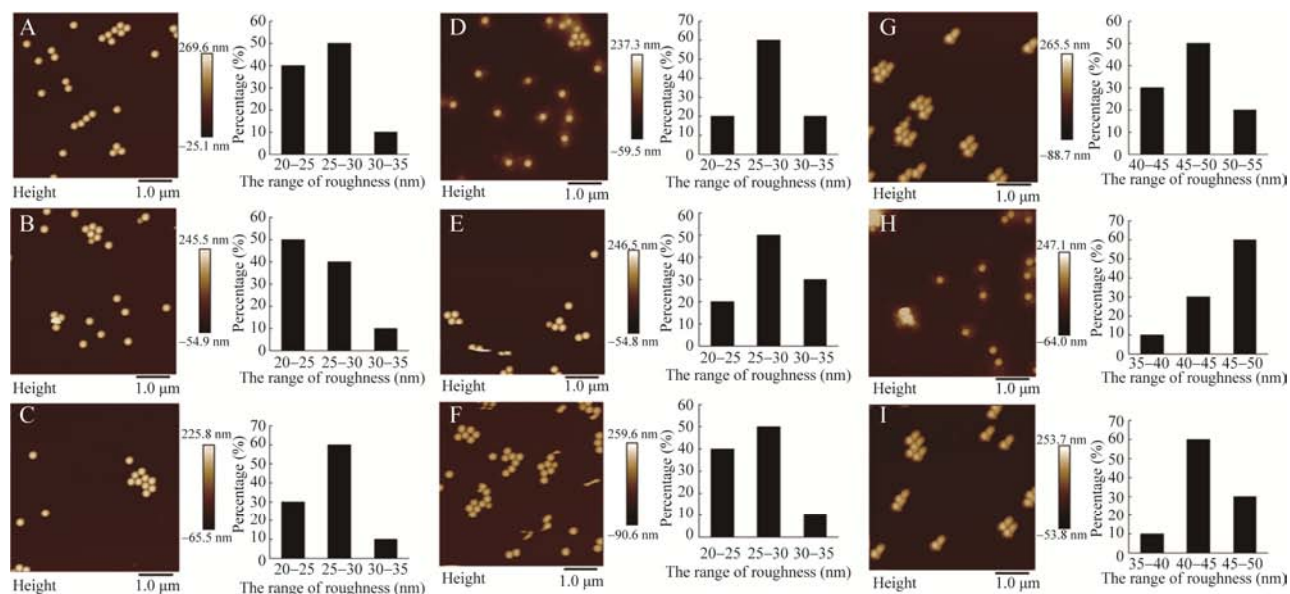


图4 相互作用后纳米塑料-叶蛋白复合物的原子力显微镜成像及表面粗糙度分布 第一组(A、B 和 C)、第二组(D、E 和 F)和第三组(G、H 和 I)分别为反应4、8 和36 h 后的氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物、羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物和无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物

Figure 4 Atomic force microscopy imaging and surface roughness distribution of nanoplastics-leaf protein complex after interaction. Group 1 (A, B, and C), group 2 (D, E, and F), and group 3 (G, H, and I) represent amino-modified nanoplastics-leaf protein complexes, carboxyl-modified nanoplastics-leaf protein complexes, and unmodified nanoplastics-leaf protein complexes after 4 h, 8 h, and 36 h of reaction.

2.3 纳米塑料-蛋白复合物水合粒径

氨基修饰纳米塑料、羧基修饰纳米塑料和无修饰纳米塑料的水合粒径分别为 252.50、213.60 和 191.80 nm (图 5)。3 种纳米塑料-叶蛋白复合物的水合粒径表现出随反应时间的延长而增加的特点。在反应 36 h 后, 氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物、羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物和无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物的水合粒径分别达到 344.67、249.67 和 257.33 nm, 与其对应的纳米塑料相比, 各增加了 91.37、47.53 和 64.63 nm, 而且氨基修饰纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径明显高于羧基修饰和无修饰的纳米塑料的蛋白复合物, 表明氨基修饰纳米塑料表面具有更大的蛋白吸附能力。另外还发现, 3 种纳米塑料-蛋白复合物水合粒径表现出较明显地随着反应时间的延长而增大的时间变化特点。其时间变化可以大致分为 3 个阶段, 第一阶段(0–8 h): 纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径上升阶段; 第二阶段(8–16 h): 纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径增长趋势停止, 趋于稳定阶段。第三阶段(16–36 h): 纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径重新开始增长阶段。

2.4 纳米塑料-植物蛋白复合物的 zeta 电位

3 种纳米塑料 zeta 电位绝对值分别为: 氨基修饰纳米塑料 27.03 mV、羧基修饰纳米塑料 24.23 mV 和无修饰纳米塑料 26.83 mV。Zeta 电位和表面电荷间存在直接关系。纳米塑料-蛋白复合物的 zeta 电位绝对值大小可以反映其稳定性, zeta 电位绝对值越大稳定性越强。纳米塑料-叶蛋白复合物的 zeta 电位绝对值结果如图 6 所示。反应时间 36 h 时, 3 种纳米塑料-叶蛋白复合物的 zeta 电位绝对值分别为: 氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物(42.37 mV)>羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物(40.90 mV)>无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物(33.63 mV), 三者中氨基修饰纳米塑料-蛋白复合物最稳定, 然后分别为羧基修饰纳米塑料-蛋白复合物和无修饰纳米塑料-蛋白复合物。同时发现, 纳米塑料-蛋白复合物的 zeta 电位在 0–36 h 的时间变化可分为 3 个阶段: 第一阶段(0–2 h), 复合物的 zeta 电位绝对值急剧下降, 稳定性降低。第二阶段(2–16 h), zeta 电位绝对值增长缓慢, 相对稳定。第三阶段(16–36 h), zeta 电位绝对值迅速增加, 复合物的稳定性迅速增加。

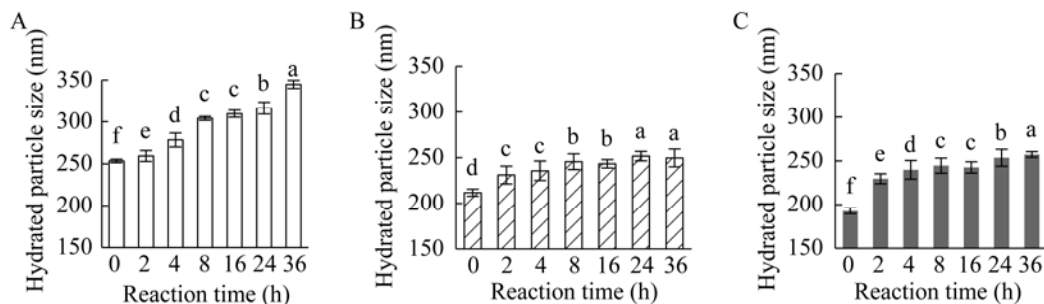


图 5 纳米塑料-植物叶蛋白复合物的水合粒径 A: 氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物. B: 羧基修饰-叶蛋白纳米塑料复合物. C: 无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物

Figure 5 Hydration particle size of nanoplastics-leaf protein complex. A: Amino-modified nanoplastics-leaf protein complexes. B: Carboxyl-modified nanoplastics-leaf protein complexes. C: Unmodified nanoplastics-leaf protein complexes. Using the significant difference letter notation method, the same letter indicates that there is no significant difference between the two ($P>0.05$), and vice versa.

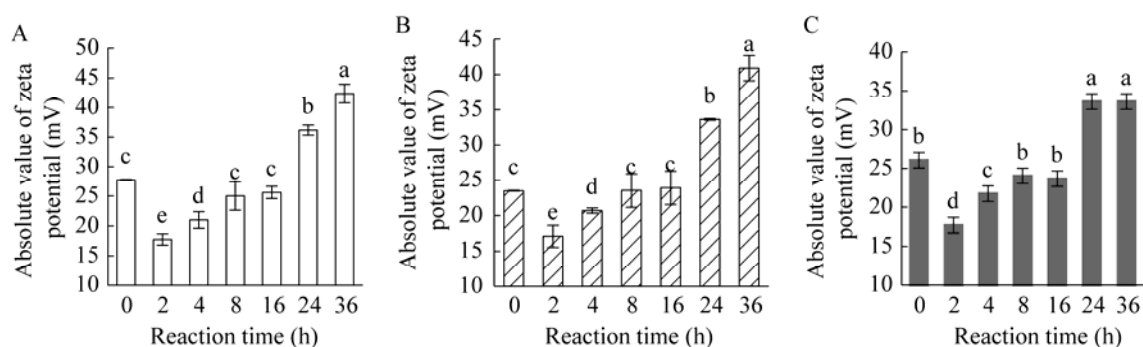


图 6 纳米塑料-叶蛋白复合物的 zeta 电位绝对值 A: 氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物. B: 羧基修饰-叶蛋白纳米塑料复合物. C: 无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物

Figure 6 Zeta potential absolute of polystyrene nanoplastics-leaf protein complex. A: Amino-modified nanoplastics-leaf protein complexes. B: Carboxyl-modified nanoplastics-leaf protein complexes. C: Unmodified nanoplastics-leaf protein complexes. Using the significant difference letter notation method, the same letter indicates that there is no significant difference between the two ($P>0.05$), and vice versa.

2.5 纳米塑料对蛋白的吸附选择

2.5.1 纳米塑料对同等电点蛋白的吸附选择

LC-MS/MS 从不同处理的纳米塑料-蛋白复合物中分别检测出数量不一的蛋白质。对 ExPASy 数据库及 NCBI 数据库中各蛋白等电点的查询结果表明(图 7), 在叶蛋白中, 氨基修饰纳米塑料偏好等电点 5-7 的蛋白质, 羧基修饰纳米塑料对蛋白的等电点吸附选择没有明显偏好, 较为平均, 无修饰纳米塑料明显偏好等电点在 6-8 范围内的蛋白质。

2.5.2 纳米塑料对不同分子量蛋白的吸附选择

根据质谱结果显示出的各个蛋白的理论分子量可以判断不同表面修饰纳米塑料对特定分子量范围蛋白质的吸附偏好。结果显示, 在纳米塑料-叶蛋白的形成过程中, 3 种纳米塑料均偏好吸附蛋白分子量在 0-60 kDa 范围内的蛋白。在氨基修饰纳米塑料-叶蛋白冠中, 分子量在 20-40 kDa 范围内的蛋白占比 24%; 在羧基修饰纳米塑料-叶蛋白冠中, 有 26% 的蛋白分子量在 40-60 kDa 范围内; 在无修饰纳米塑料-叶蛋白冠中, 有 30% 的蛋白分子量在 20-40 kDa 范围内(图 8)。

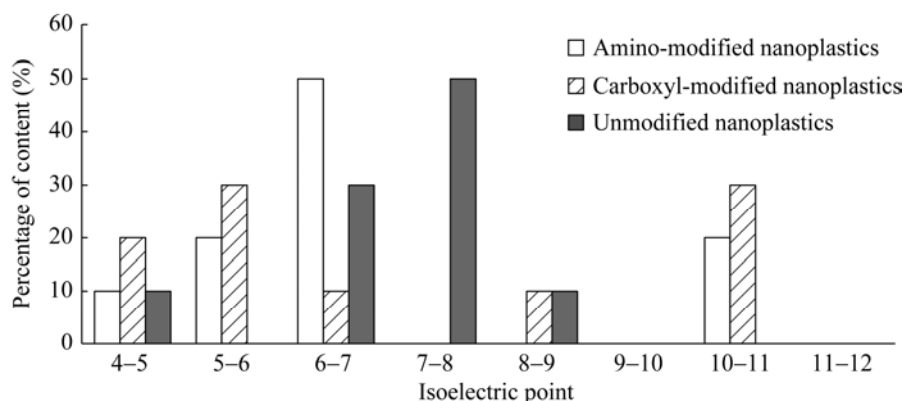


图 7 蛋白组分等电点分布图

Figure 7 Isoelectric point distribution map of protein corona composition.

2.6 蛋白冠蛋白组分 GO 注释分析结果

根据 GO 注释从生物学过程、细胞组分以及

分子功能 3 个角度对蛋白冠组分进行分析,结果表明电荷会影响到蛋白冠的组成(图 9)。

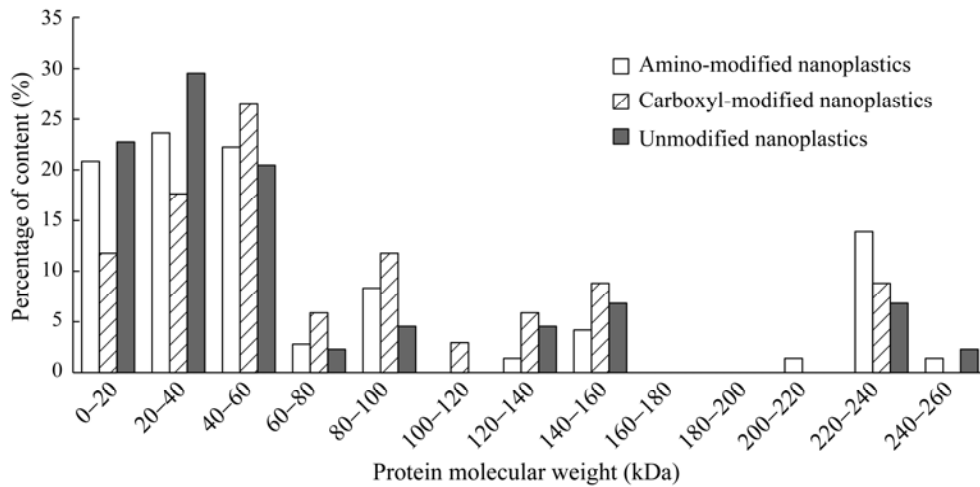
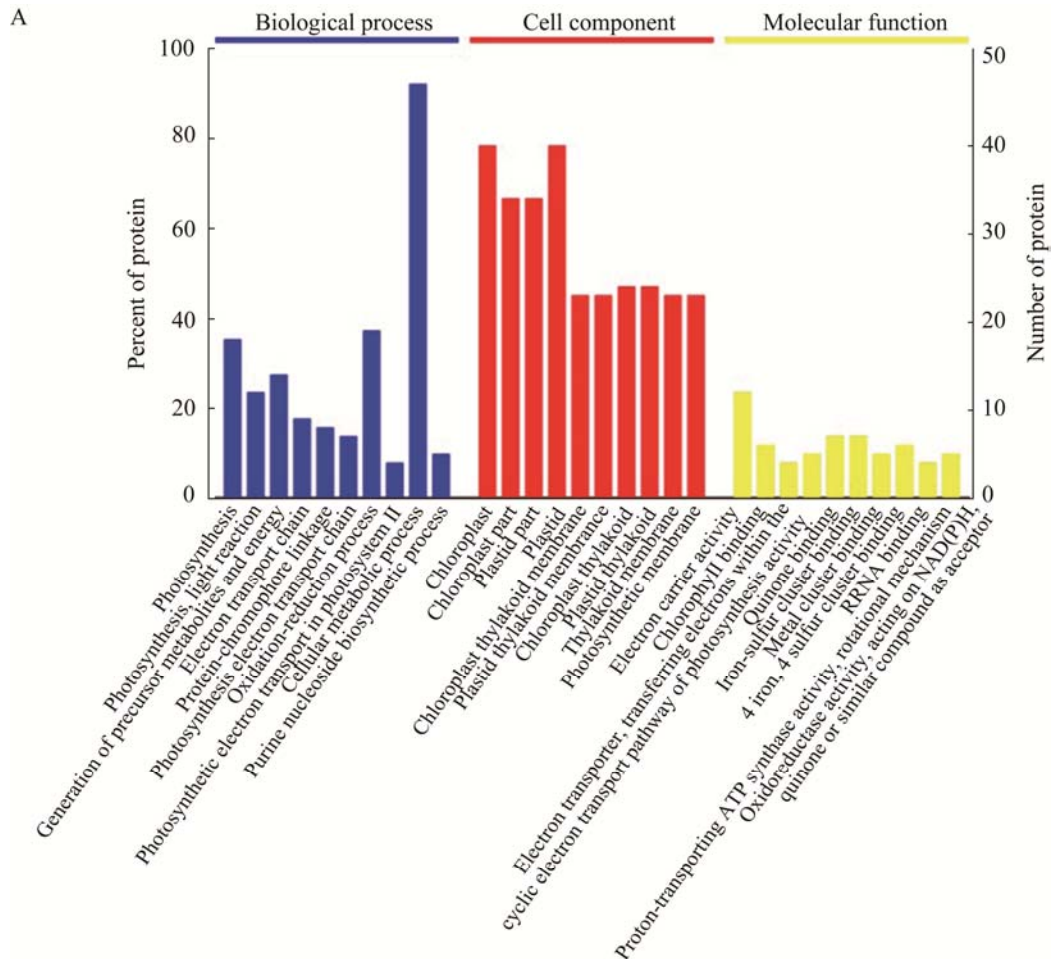


图 8 蛋白冠组分分子量分布图

Figure 8 The histogram of molecular weight distribution of protein corona.



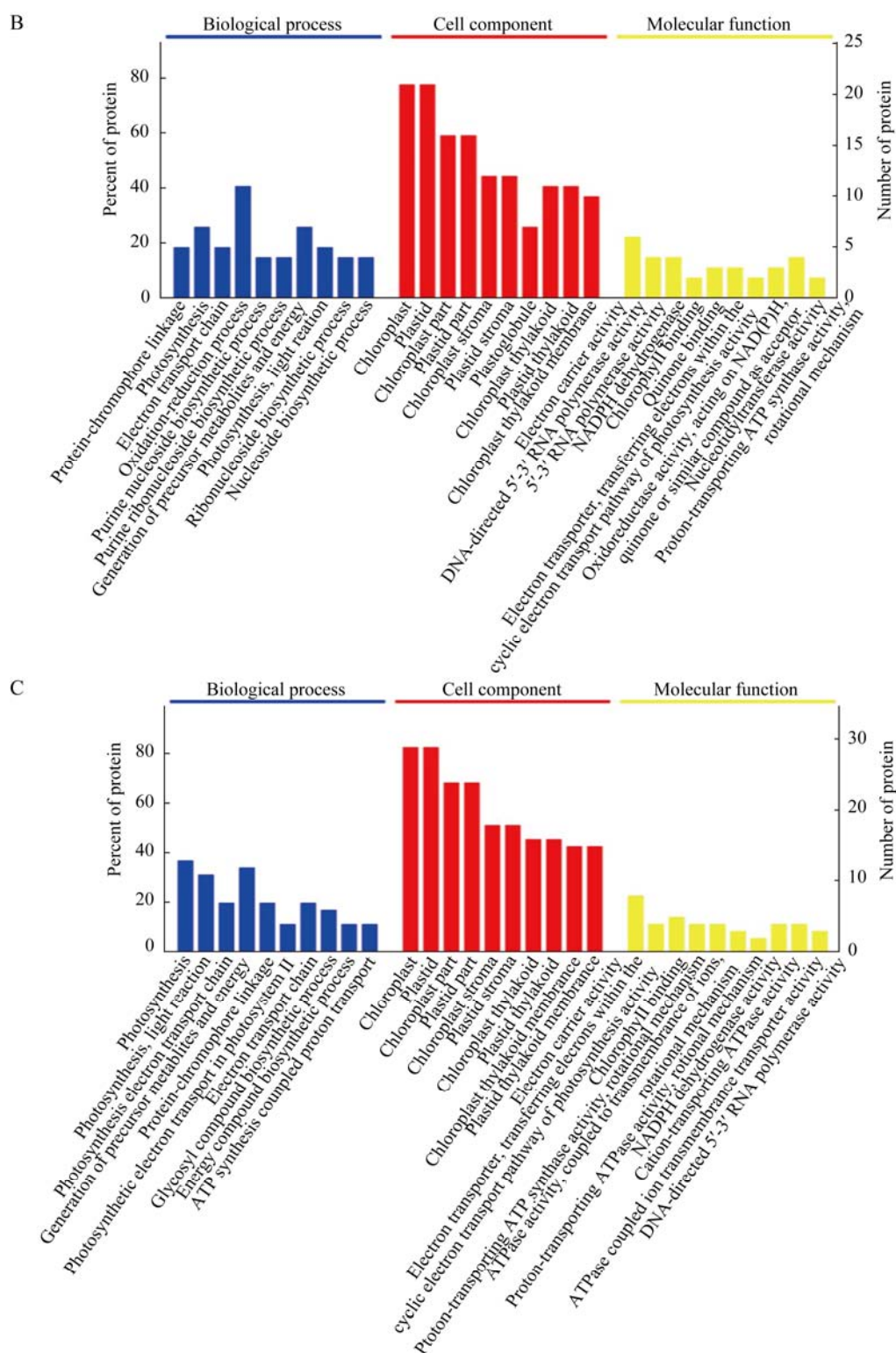


图9 纳米塑料-叶蛋白冠蛋白组分的GO注释分析 A: 氨基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物. B: 羧基修饰纳米塑料-叶蛋白复合物. C: 无修饰纳米塑料-叶蛋白复合物

Figure 9 GO annotation analysis of polystyrene nanoplastics-leaf protein corona components. A: Amino-modified nanoplastics-leaf protein complexes. B: Carboxyl-modified nanoplastics-leaf protein complexes. C: Unmodified nanoplastics-leaf protein complexes.

分析发现,氨基修饰纳米塑料-叶蛋白冠中有接近 90%的蛋白都参与到细胞代谢过程,其次是参与到植物氧化还原作用和光合作用的蛋白数量。羧基修饰的纳米塑料-叶蛋白冠中参与氧化还原生物过程的蛋白种类最多,其次是参与前提代谢物的生成以及能量电子传递的蛋白数量。无修饰纳米塑料-叶蛋白冠中有将近 40%的蛋白质参与到植物的光合作用,而参与植物前体代谢物的生成以及能量传递过程的蛋白数量仅次于参与光合作用的蛋白数量。

3 种纳米塑料在与叶蛋白相互作用形成蛋白冠后,细胞组分高度相似。在 3 种蛋白冠组分中均含有大量与光合作用相关的细胞组分蛋白,如:叶绿体组分、光合膜组分、类囊体膜组分等。

3 种纳米塑料与叶蛋白反应形成蛋白冠后,3 种纳米塑料均吸附了影响电流载体活性的相关蛋白,且电流载体活性相关蛋白在 3 种蛋白冠中含量均超过其他分子功能蛋白。

3 讨论

3.1 纳米塑料-植物蛋白冠的形成过程

由于独特的理化性质,当纳米颗粒进入生物体后很容易和生物体液中的大分子物质,如蛋白质,发生相互作用,在表面吸附一层或多层蛋白,形成纳米颗粒-蛋白质复合物,即蛋白冠^[20]。本研究对比纳米塑料和纳米塑料-蛋白复合物的形貌及粒径分布发现,纳米塑料与蛋白作用后,由于外部包裹蛋白的影响,会改变其原有形貌和表面粗糙度,并在表面形成分布不均匀的冠状物质,说明纳米塑料对植物中的蛋白具有一定的吸附作用,证明了纳米塑料可以与蛋白发生相互作用形成蛋白冠。

有研究表明,蛋白冠的形成是一个由软蛋白冠逐渐转化成硬蛋白冠的动态过程^[21]。而水合粒径和 zeta 电位绝对值的时间变化可以较好反

映出不同反应阶段纳米塑料-蛋白复合物的形成和稳定性。在 0-36 h 的反应时间内,纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径和 zeta 电位的时间变化可大致分为 3 个阶段。第一阶段为反应时间 0-8 h: 3 种复合物的水合粒径显著增加,是大量蛋白质在裸露纳米塑料表面的积累阶段。该阶段纳米塑料-蛋白复合物的 zeta 电位绝对值相对较低,复合物不稳定,属于软蛋白冠形成阶段。第二阶段为反应时间 8-16 h: 3 种纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径和 zeta 电位增加趋势停止,是纳米塑料-蛋白复合物的稳定阶段,这一现象可能是含量丰富的蛋白和高亲和力的蛋白在颗粒表面的竞争所致。第三阶段为反应时间 16-36 h: 3 种纳米塑料-蛋白复合物的水合粒径和 zeta 电位绝对值增加,一方面表明更多的蛋白质在蛋白冠层上持续积累,另一方面也表明蛋白冠进入相对稳定的硬蛋白冠的形成阶段。因此,3 种不同表面表征的纳米塑料在与蛋白质相互作用时都经过了从软蛋白冠到硬蛋白冠的转化过程。

还有研究证明,表面电荷会影响纳米颗粒对蛋白的吸附量^[22-24]。本研究中也同样存在不同电荷纳米塑料对蛋白的吸附量差异。结合水合粒径和 zeta 电位的测定结果可以发现,3 种纳米塑料在与蛋白作用形成蛋白冠的过程中吸附蛋白的量有所不同。与叶蛋白反应 36 h 后,纳米塑料表面吸附的蛋白总量对比为氨基修饰纳米塑料>无修饰纳米塑料>羧基修饰纳米塑料,zeta 电位绝对值则为氨基修饰纳米塑料>羧基修饰纳米塑料>无修饰纳米塑料。由此推断,氨基修饰纳米塑料对蛋白质的吸附能力更强,形成的硬蛋白冠的稳定性均强于羧基修饰纳米塑料和无修饰纳米塑料。

3.2 纳米塑料对蛋白的吸附选择

Sakulkhu 等^[25]研究发现,不同电性纳米颗粒对蛋白具有选择吸附性。本研究通过质谱分析

证实,不同电性的纳米塑料对于蛋白质同样存在选择吸附性。在纳米塑料-叶蛋白冠的形成过程中,氨基修饰纳米塑料表现出对分子量 20–40 kDa、等电点 5–7 范围内蛋白的吸附偏好。羧基修饰纳米塑料对 40–60 kDa 分子量范围内蛋白的吸附偏好,且未表现出特定等电点范围内蛋白的吸附偏好。无修饰纳米塑料表现出对分子量 20–40 kDa、等电点 6–8 范围内蛋白的吸附偏好。因此,蛋白质的电荷种类及其分子量在一定程度上决定了它们对纳米塑料表面的亲和力。

Arora 等^[13]研究表明,纳米金颗粒可以影响芥菜的产量。近期还有研究进一步表明,纳米金颗粒与芥菜粗蛋白反应生成稳定的硬蛋白冠之后,蛋白冠组分中有大约 10%是蛋白酶,而蛋白酶的活性对于植物的衰老至关重要。研究者推测,纳米金颗粒引起的芥菜叶片数量增加可能是由于纳米金颗粒表面蛋白冠的形成所导致的^[19]。Chetwynd 等^[26]研究发现,纳米塑料进入血浆蛋白环境吸附蛋白形成蛋白冠后,蛋白冠组分中含有能够显著影响生物代谢的蛋白,并推断可能会对生物代谢产生影响,综上所述,蛋白冠的成分似乎会对植物的生理过程造成影响。本研究发现,所有处理的蛋白冠组分中均存在或多或少的蛋白参与到光合作用及其相关过程或光合作用有关细胞的组成。多数处理中参与或影响到光合作用的蛋白在蛋白冠组分总量中占比很高。这一结果表明,蛋白冠的形成必然会使周围蛋白环境中的某些蛋白含量发生变化。有相关研究表明,蛋白冠的形成会对蛋白质的结构及功能产生影响^[27]。因此推断,聚苯乙烯纳米塑料-新几内亚凤仙蛋白冠的形成会对新几内亚凤仙光合作用相关蛋白产生影响,进而影响到新几内亚凤仙的光合作用,而这种影响是正面影响还是负面影响则有待进一步研究。

本研究仅选用了与土壤中来源相关的聚苯

乙烯纳米塑料与新几内亚凤仙叶蛋白进行实验,验证蛋白冠的形成及对纳米塑料和植物蛋白的影响。下一步研究工作可选择环境中常见的多种纳米塑料与更多有代表性的生物蛋白开展多元化的系统研究,还可结合分子模拟手段进行纳米塑料在体内形成蛋白冠的相关研究,从而为探索纳米塑料的环境影响提供更多理论与数据支持。此外,区别于纳米金和纳米银等金属纳米颗粒,属于非金属的纳米塑料在生物体内的定位及定量分析存在较大困难,检测手段有很多限制,今后可以尝试拓展新思路,通过鉴定蛋白冠的组成反推纳米塑料进入植物器官或细胞的过程。

REFERENCES

- [1] GEYER R, JAMBECK JR, LAW KL. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1700782.
- [2] da COSTA JP, SANTOS PSM, DUARTE AC, ROCHA-SANTOS T. (Nano) plastics in the environment-sources, fates and effects[J]. *The Science of the Total Environment*, 2016, 566/567: 15-26.
- [3] LEE Y K, CHOI EJ, WEBSTER TJ, KIM SH, KHANG D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2015, 10: 97-112.
- [4] CHONG Y, GE CC, YANG ZX, GARATE JA, GU ZL, WEBER JK, LIU LL, ZHOU RH. Reduced cytotoxicity of graphene nanosheets mediated by blood-protein coating[J]. *Acs Nano*, 2015, 9(6): 5713-24.
- [5] JULING S, NIEDZWIECKA A, BÖHMERT L, LICHTENSTEIN D, SELVE S, BRAEUNING A, THÜNEMANN AF, KRAUSE E, LAMPEN A. Protein corona analysis of silver nanoparticles links to their cellular effects[J]. *Journal of Proteome Research*, 2017, 16(11): 4020-4034.
- [6] GARCÍA-ÁLVAREZ R, HADJIDEMETRIOU M, SÁNCHEZ-IGLESIAS A, LIZ-MARZÁN LM, KOSTARELOS K. *In vivo* formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(3): 1256-1264.
- [7] SCHWAB F, ROTHEN-RUTISHAUSER B, PETRI-FINK A. When plants and plastic interact[J]. *Nature Nanotechnology*, 2020, 15(9): 729-730.
- [8] 李连祯, 周倩, 尹娜, 涂晨, 骆永明. 食用蔬菜能吸收和积累微塑料[J]. *科学通报*, 2019, 64(9): 928-934. LI LZ, ZHOU Q, YIN N, TU C, LUO YM. Uptake and

- accumulation of microplastics in an edible plant[J]. Chinese Science Bulletin, 2019, 64(9): 928-934 (in Chinese).
- [9] 王雅蓁, 龚涛, 李圆, 高会乐. 卵巢癌患者血浆蛋白冠的形成及其对纳米粒靶向性的影响[J]. 药学学报, 2021, 56(2): 604-609.
WANG YZ, GONG T, LI Y, GAO HL. Preparation and targeting capability of corona forming in human ovarian plasma[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(2): 604-609 (in Chinese).
- [10] 汤玉云, 谷晓, 高金超, 章倩, 黄萌, 汪安恬, 余人和, 高小玲. APP/PS1 小鼠中 PEG-PLA 纳米粒的表面蛋白冠组成及其脑内递送的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(24): 4601-4608.
TANG YY, GU X, GAO JC, ZHANG Q, HUANG M, WANG AT, YU RH, GAO XL. The study of protein corona composition and brain delivery of PEG-PLA nanoparticles in APP/PS1 mice[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2021, 21(24): 4601-4608 (in Chinese).
- [11] PRAKASH S, Deswal R. Analysis of temporally evolved nanoparticle-protein corona highlighted the potential ability of gold nanoparticles to stably interact with proteins and influence the major biochemical pathways in *Brassica juncea*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 146: 143-156.
- [12] LESNIAK A, FENAROLI F, MONOPOLI MP, ÅBERG C, DAWSON KA, SALVATI A. Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells[J]. ACS Nano, 2012, 6(7): 5845-5857.
- [13] ARORA S, SHARMA P, KUMAR S, NAYAN R, KHANNA PK, ZAIDI MGH. Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*[J]. Plant Growth Regulation, 2012, 66(3): 303-310.
- [14] GEBAUER JS, MALISSEK M, SIMON S, KNAUER SK, MASKOS M, STAUBER RH, PEUKERT W, TREUEL L. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure[J]. Langmuir, 2012, 28(25): 9673-9679.
- [15] DOMINGUEZ-MEDINA S, BLANKENBURG J, OLSON J, LANDES CF, LINK S. Adsorption of a protein monolayer via hydrophobic interactions prevents nanoparticle aggregation under harsh environmental conditions[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2013, 1(7): 833-842.
- [16] SHIU RF, VAZQUEZ CI, CHIANG CY, CHIU MH, CHEN CS, NI CW, GONG GC, QUIGG A, SANTOSCHI PH, CHIN WC. Nano- and microplastics trigger secretion of protein-rich extracellular polymeric substances from phytoplankton[J]. The Science of the Total Environment, 2020, 748: 141469.
- [17] MA ZF, BAI J, JIANG XE. Monitoring of the enzymatic degradation of protein corona and evaluating the accompanying cytotoxicity of nanoparticles[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(32): 17614-17622.
- [18] DELL'ORCO D, LUNDQVIST M, OSLAKOVIC C, CEDERVALL T, LINSE S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid[J]. PLoS One, 2010, 5(6): e10949.
- [19] WEI LF, ZHANG Q, HOU XW, QU GB, LIU JY, JIANG GB. Species-dependent eco-corona dictates the aggregation of black phosphorus nanosheets: the role of protein and calcium[J]. Environmental Science: Nano, 2021, 8(11): 3098-3109.
- [20] LYNCH I, DAWSON KA. Protein-nanoparticle interactions[J]. Nano Today, 2008, 3(1/2): 40-47.
- [21] MILANI S, BOMBELLI FB, PITEK AS, DAWSON KA, RÄDLER J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona[J]. ACS Nano, 2012, 6(3): 2532-2541.
- [22] LAI WJ, WANG QS, LI LM, HU ZY. Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: analysis of protein corona reveals specific binding patterns[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 152: 317-325.
- [23] CUI GX, SU WT, TAN MQ. Formation and biological effects of protein corona for food-related nanoparticles[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2022, 21(2): 2002-2031.
- [24] LIU N. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells[J]. Chemosphere, 2020, 245: 125624.
- [25] SAKULKHU U, MAHMOUDI M, MAURIZI L, COULLEREZ G, HOFMANN-AMTENBRINK M, VRIES M, MOTAZACKER M, REZAEI F, HOFMANN H. Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona[J]. Biomaterials Science, 2015, 3(2): 265-278.
- [26] CHETWYND AJ, ZHANG W, THORN JA, LYNCH I, RAMAUTAR R. The nanomaterial metabolite corona determined using a quantitative metabolomics approach: a pilot study[J]. Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany), 2020, 16(21): e2000295.
- [27] CEDERVALL T, LYNCH I, FOY M, BERGGÅRD T, DONNELLY SC, CAGNEY G, LINSE S, DAWSON KA. Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles[J]. Angewandte Chemie (International Ed in English), 2007, 46(30): 5754-5756.

(本文责编 陈宏宇)