

## 红毛藻 R-藻红蛋白的提取纯化及在 Cu<sup>2+</sup>检测中的应用

蔡思学<sup>1,2</sup>, 李月<sup>2</sup>, 王芳<sup>1\*</sup>, 姜泽东<sup>2</sup>, 王力<sup>2</sup>

<sup>1</sup>泉州师范学院海洋与食品学院 福建泉州 362000

<sup>2</sup>集美大学食品与生物工程学院 福建厦门 361021

**摘要** 采用纤维素酶法提取红毛藻藻红蛋白,并对其进行纯化。利用 Cu<sup>2+</sup>能使 R-藻红蛋白发生荧光猝灭的特性,建立一种荧光检测 Cu<sup>2+</sup>含量的方法。研究表明:当提取温度 40℃、提取时间 5 h、加酶量 2.5%时,提取的 R-藻红蛋白质量浓度为 43.64 mg/mL。使用饱和度为 60%的硫酸铵沉淀和 DEAE Sepharose FF 柱纯化,得到纯度为 2.1(A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub>) 的药品级 R-藻红蛋白,其对 Cu<sup>2+</sup>有良好的选择性,最佳检测条件为:R-藻红蛋白质量浓度 1.2 mg/mL、水浴温度 30℃、反应时间 15 min、缓冲液 pH 7.0,在 Cu<sup>2+</sup> 0.5~50 μmol/L 范围内,相对荧光强度与 Cu<sup>2+</sup>浓度之间存在良好的线性关系,最低检出限(S/N=3)0.06308 μmol/L。将此方法用于实际样品中 Cu<sup>2+</sup>含量的检测,样品回收率为 94.50%~106.03%。方法具有绿色安全、检测时间短、灵敏度高、选择性好等优势,对水产品中重金属 Cu<sup>2+</sup>含量的检测有广泛的应用前景。

**关键词** R-藻红蛋白;红毛藻;提取纯化;荧光探针;Cu<sup>2+</sup>

文章编号 1009-7848(2022)09-0276-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.09.029

红毛藻是一种独特的可食用经济海藻,主要分布在北大西洋亚热带海区和温带海区以及北太平洋的西部和我国福建省等东南沿海地区,其味道鲜美,风味独特,含有大量不饱和脂肪酸,18种氨基酸,丰富的膳食纤维和 Ca、Mg、K 等丰富的营养元素<sup>[1-2]</sup>,并富含多糖、多酚和藻胆蛋白等多种生物活性物质。据报道红毛藻具有抗病毒<sup>[3]</sup>,抑制黑色素形成<sup>[4]</sup>,抑菌<sup>[5]</sup>,可以降低心血管疾病和慢性代谢疾病的风险<sup>[6]</sup>等作用。

藻红蛋白(PE)属于藻胆蛋白的一种,是由藻红胆素(PEB)的吡咯环与脱辅基蛋白的半胱氨酸通过硫醚键结合而成的具有荧光特性的蛋白<sup>[7]</sup>,在红藻和蓝藻中均存在,具有 R-、B-、C-3 种类型,其中 R-藻红蛋白主要由红毛藻产生,其含量是紫菜中含量的 4~5 倍<sup>[8]</sup>。因 R-藻红蛋白具有光学和光谱特性,高吸收系数和高荧光产率等特性而被视为荧光共振能量转移分析<sup>[9]</sup>、免疫分析、流式细胞术<sup>[10]</sup>和组织化学等生物技术应用中不可替代<sup>[11]</sup>。

随着工业的发展,重金属污染变得越发严重,由于重金属离子是不可生物降解的,即便是痕量

也具有高毒性,并且重金属离子能在生物体内富集,威胁生态系统和人体健康,因此重金属离子污染已成为全世界瞩目的问题<sup>[12-13]</sup>。Cu<sup>2+</sup>是人体中含量第三高的过渡金属<sup>[14]</sup>,是动植物必需的微量元素,然而,它在高浓度下会对人体产生诸多不良影响,如导致肝硬化、肾损伤和阿尔茨海默病等<sup>[15-16]</sup>。迫切需要检测 Cu<sup>2+</sup>含量的方法。目前检测 Cu<sup>2+</sup>的方法主要有化学传感器法<sup>[17]</sup>、比色法<sup>[18-19]</sup>、电化学发光传感器法<sup>[20]</sup>、荧光探针法等,然而 R-藻红蛋白作为荧光探针检测 Cu<sup>2+</sup>含量鲜见报道。本文从红毛藻中提取纯化藻红蛋白,以其为荧光探针,Cu<sup>2+</sup>为猝灭剂,建立一种 Cu<sup>2+</sup>含量的检测方法。

### 1 材料与设备

红毛藻,福建省莆田市南日镇人工养殖产品;纤维素酶(20 000 U/g),诺维信生物有限公司;SDS-PAGE 标准蛋白,立陶宛 Fermentas 公司;硫酸铵、五水硫酸铜,国药化学试剂有限公司;DEAE Sepharose FF,瑞典 GE Healthcare 公司;过硫酸铵(APS)、30%丙烯酰胺,上海 Sigma-Aldrich 公司;明虾、蛤蜊和金鲳鱼,均购于当地大润发超市。

Agilent Cary Eclipse 荧光分光光度计,美国 Agilent 公司;Nanodrop 1000 微量蛋白核酸测定仪,美国热电 Thermo 赛默飞世尔公司;LAMBDA 265 紫外-可见光分光光度计,上海 PerkinElmer

收稿日期:2021-09-05

基金项目:福建省自然科学基金项目(2022J01132845)

作者简介:蔡思学(1997—),女,硕士生

通信作者:王芳 E-mail: dwf320@163.com