

红毛藻 R-藻红蛋白的提取纯化及在 Cu²⁺检测中的应用

蔡思学^{1,2}, 李月², 王芳^{1*}, 姜泽东², 王力²

¹泉州师范学院海洋与食品学院 福建泉州 362000

²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 Cu²⁺能使 R-藻红蛋白发生荧光猝灭的特性,建立一种荧光检测 Cu²⁺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(A₆₂₀/A₂₈₀) 的药品级 R-藻红蛋白,其对 Cu²⁺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 Cu²⁺ 0.5~50 μmol/L 范围内,相对荧光强度与 Cu²⁺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 Cu²⁺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 Cu²⁺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;Cu²⁺

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^[1-2],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^[3],抑制黑色素形成^[4],抑菌^[5],可以降低心血管疾病和慢性代谢疾病的风险^[6]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^[7],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^[8]。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^[9]、免疫分析、流式细胞术^[10]和组织化学等生物技术应用中不可替代^[11]。

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^[12-13]。Cu²⁺是人体中含量第三高的过渡金属^[14],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^[15-16]。迫切需要检测 Cu²⁺含量的方法。目前检测 Cu²⁺的方法主要有化学传感器法^[17]、比色法^[18-19]、电化学发光传感器法^[20]、荧光探针法等,然而 R-藻红蛋白作为荧光探针检测 Cu²⁺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,Cu²⁺为猝灭剂,建立一种 Cu²⁺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

仪器有限公司;Bio. Profile 凝胶成像及分析系统, 法国 Vbler Lourmant 公司;TS-2 脱色摇床, 海门其林贝尔仪器制造有限公司。

2 试验方法

2.1 红毛藻 *R*-藻红蛋白的提取

因 *R*-藻红蛋白提取物在紫外吸收波长 455, 565 和 592 nm 处有特征吸光值^[21]。利用纤维素酶法^[22], 称取 1.0 g 红毛藻藻粉于 100 mL 离心管中, 加入 20 mL 蒸馏水, 后加入一定量的纤维素酶, 混合均匀, 于恒温水浴锅中酶解破壁, 酶解结束后取出冷却, 置于高速离心机中 8 000 r/min, 离心 15 min, 取上清液, 通过紫外-可见分光光度计测定藻红蛋白浓度。并且利用正交优化试验确定酶解温度 (20, 25, 30, 35, 40 °C), 酶解时间 (2, 3, 4, 5, 6 h), 加酶量 (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%) 作为纤维素酶解破壁的最优条件。

2.2 红毛藻 *R*-藻红蛋白的纯化

为得到纯度较高的藻红蛋白, 利用两步纯化法对红毛藻 *R*-藻红蛋白进行纯化。首先利用硫酸铵分级沉降粗红毛藻 *R*-藻红蛋白, 在搅拌条件下缓慢向酶解后的藻红蛋白上清液加入经研磨后的硫酸铵至其饱和度为 20%, 4 °C 静置过夜, 然后于高速离心机中 (8 000 r/min, 15 min) 离心, 保留 20% 盐析沉淀。取其分离出的上清液, 同样按照上述方法向溶液中加入硫酸铵至溶液的饱和度达 30%, 4 °C 静置过夜, 离心分离上清和沉淀。重复上述操作步骤, 使溶液中硫酸铵的饱和度达 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%。将各饱和度硫酸铵的沉降物分别溶解于 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 6.8) 中, 后转移至截留分子量 10 ku 的透析袋中, 全程避光, 4 °C 条件下透析脱盐, 每 3 h 换 1 次外液, 并用电导仪检验是否透析完成。

利用 DEAE Sepharose FF 二次纯化 *R*-藻红蛋白, 用 AKTA 蛋白纯化系统将透析后的 *R*-藻红蛋白液泵入已平衡后的 DEAE Sepharose FF 层析柱中, 用 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 6.8) 冲柱, 洗去未吸附的藻红蛋白及杂质。待基线平衡后, 使用含 0.1 mol/L NaCl~0.6 mol/L NaCl 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, 线性洗脱并收集流出

液, 待洗脱平衡时, 收集的每管流出液测定其在 A_{565} 和 A_{280} 的紫外吸收波长, 并绘制洗脱曲线, 流出液于 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 红毛藻 *R*-藻红蛋白的鉴定

通过测定 *R*-藻红蛋白在波长 200~800 nm 范围内的紫外吸收值; 测定狭缝宽度为 5.0 nm, 扫描 200~800 nm 范围内 *R*-藻红蛋白的荧光激发光谱与发射光谱; 根据参考文献 [23-24] 配置 SDS-PAGE 电泳凝胶所需溶液并测定 *R*-藻红蛋白分子质量以对 *R*-藻红蛋白进行鉴定。

2.4 *R*-藻红蛋白对水产品中 Cu^{2+} 含量的检测

2.4.1 荧光探针检测条件的优化 分别取不同 pH 值 (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0) 缓冲液配制不同浓度 (0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 mg/mL) *R*-藻红蛋白 2 mL 及 1 mL 浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 加入 10 mL 离心管中, 混匀, 分别于不同温度 (20, 25, 30, 35, 40, 45 °C) 下反应一定时间, 用荧光分光光度计检测荧光强度的变化, 以加 1 mL 超纯水的 *R*-藻红蛋白液为对照组, 荧光强度记 F_0 , 加入 1.0 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的 *R*-藻红蛋白为试验组, 荧光强度记 F , 计算相对荧光强度 (F_0/F), 研究 pH、*R*-藻红蛋白浓度和温度对 Cu^{2+} 检测效果的影响。后在 *R*-藻红蛋白质量浓度 1.2 mg/mL, Cu^{2+} 浓度 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.0) 的条件下, 以不加 Cu^{2+} 的 *R*-藻红蛋白荧光探针作为空白对照, 用荧光分光光度计检测体系中每隔 1 min 的荧光强度变化, 研究检测时间对 Cu^{2+} 检测效果的影响。

2.4.2 金属干扰离子共存对 Cu^{2+} 检测效果的影响 在 2 mL 1.2 mg/mL *R*-藻红蛋白中分别加入不同的干扰离子 (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Al_3 , Ca^{2+}) 和 Cu^{2+} , 按照 2.4.1 节的方法进行反应, 计算相对荧光强度 (F_0/F) 的大小, 研究对干扰离子存在的情况下 *R*-藻红蛋白荧光探针对 Cu^{2+} 检测效果的影响。

2.4.3 Cu^{2+} 对 *R*-藻红蛋白的荧光淬灭 在优化条件下, 测定加入不同浓度 (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 $\mu\text{mol/L}$) 的 Cu^{2+} 后 *R*-藻红蛋白荧光探针检测体系的荧光强度 (F), 以不加 Cu^{2+} 的 *R*-藻红蛋白荧光强度 (F_0) 作为空白对照, 计算相对荧光强度 (F_0/F)。以 Cu^{2+} 浓度为 X 轴, 相对荧光强度 (F_0/F) 为 Y

轴,绘制标准曲线。

2.5 样品检测

首先进行样品的预处理,取金鲳鱼、蛤蜊的可食用部位,明虾的虾头和虾体,分别用蒸馏水洗净并沥干,-40℃冰箱预冷冻,转移至冻干机中冷冻干燥,粉碎过筛。后将样品粉末按照国标^[25]进行前处理,并将所得样品消解液稀释15倍,置于4℃冰箱冷藏备用。按照2.4.1节中的方法进行样品中Cu²⁺含量的检测。

2.6 数据处理

使用正交设计助手、SPSS Statistics 17.0、Microsoft Excel 软件进行数据统计,使用 Origin Pro 8.5 软件绘制图形与分析。所有试验均平行测定3次。

3 结果与分析

3.1 纤维素酶解法提取红毛藻 R-藻红蛋白

通过正交试验以酶解温度(℃)、酶解时间(h)、酶添加量(%)为因素,溶解破壁后 R-藻红蛋白浓度为指标,优化 R-藻红蛋白的提取工艺。影响顺序为酶解温度>酶解时间>加酶量,其中酶解温度的影响最为显著,但是温度不可超过40℃否则 R-藻红蛋白将不稳定分解^[26],酶解时间为5h最优,加酶量不显著,原因可能是酶活性高,作用性强。因此纤维素酶解破壁的最优条件为:提取温度40℃,提取时间5h,加酶量为红毛藻藻粉的2.5%,此时提取的 R-藻红蛋白质量浓度为43.64 mg/mL。

3.2 R-藻红蛋白的纯化

硫酸铵饱和度对 R-藻红蛋白纯化效果的影响

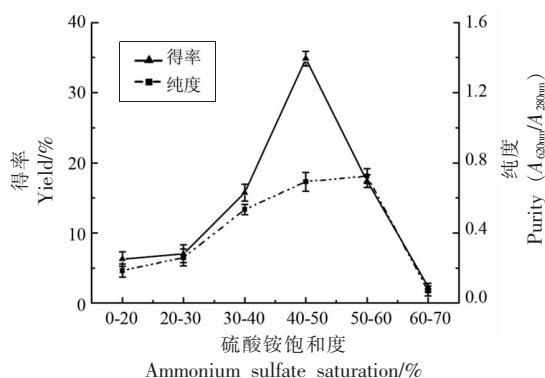


图1 R-藻红蛋白盐析曲线

Fig.1 Salting out curve of R-phycoerythrin

响如图1所示,硫酸铵的饱和度在10%~70%区间时,随硫酸铵饱和度的递增,R-藻红蛋白的得率和纯度均呈现先增加后降低的趋势,当硫酸铵饱和度达40%~50%时,R-藻红蛋白的得率达到最大,当硫酸铵饱和度达50%~60%时,R-藻红蛋白的纯度达到最大。为保证得到较高纯度和得率的 R-藻红蛋白,试验选取饱和度为60%的硫酸铵。

对初步纯化的 R-藻红蛋白液通过 DEAE Sepharose FF 柱层析进行进一步纯化处理,如图2所示,R-藻红蛋白的洗脱曲线出现3个组分,通过测定各个洗脱峰中 R-藻红蛋白在565 nm与280 nm处的紫外吸收值并计算其比值,可知 a、c 位置的 R-藻红蛋白纯度低,洗脱过程首先流出的是组分 a,其中包含未被吸附的 R-藻红蛋白和杂质蛋白,组分 c 在650 nm处出现紫外吸收峰,此处是个别藻蓝蛋白的吸收峰,说明已有杂质被洗脱下来。组分 b 处液体颜色较深,R-藻红蛋白纯度较高,R-藻红蛋白较集中,说明通过两道纯化

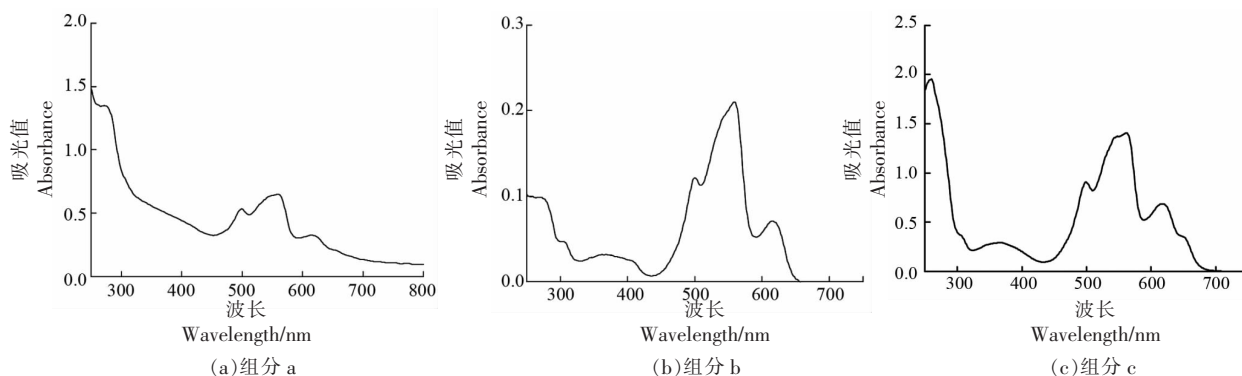


图2 DEAE Sepharose FF 层析柱的洗脱组分的紫外图谱

Fig.2 Spectrum of DEAE Sepharose FF chromatographic eluent

已达到提高 *R*-藻红蛋白纯度的目的。

3.3 *R*-藻红蛋白的鉴定及表征

R-藻红蛋白紫外可见-吸收光谱由图 2b 可知, *R*-藻红蛋白在 498 nm 和 565 nm 处有双峰, 并在 540 nm 处有一个肩峰, 而 620 nm 处显示的吸收峰可能是混有极少量的 *R*-藻蓝蛋白所致。由纯度计算公式(纯度= A_{565}/A_{280})可知, 纯化所得 *R*-藻红蛋白纯度为 2.1, 而当 *R*-藻红蛋白纯度在 0.7 以下时, *R*-藻红蛋白属于食品级, 纯度为 0.7~3.9 属于药品级, 超过 4.0 属于分析级^[27], 因此本试验

得到的 *R*-藻红蛋白已达到药品级, 纯度较高。

R-藻红蛋白荧光光谱如图 3a 所示, *R*-藻红蛋白的最大发射波长位于 574 nm 处, 这是由于 PUB 到 PEB 发色团的荧光共振能量转移(FRET)^[28], 与文献[29-30]基本一致。*R*-藻红蛋白分子质量如图 3b SDS-PAGE 电泳图所示, 标准蛋白 marker 作为对照, *R*-藻红蛋白条带在分子质量约为 17.0, 19.0, 27.0 ku 左右出现 3 条清晰的条带, 分别对应 *R*-藻红蛋白的 α , β , γ 3 个亚基。

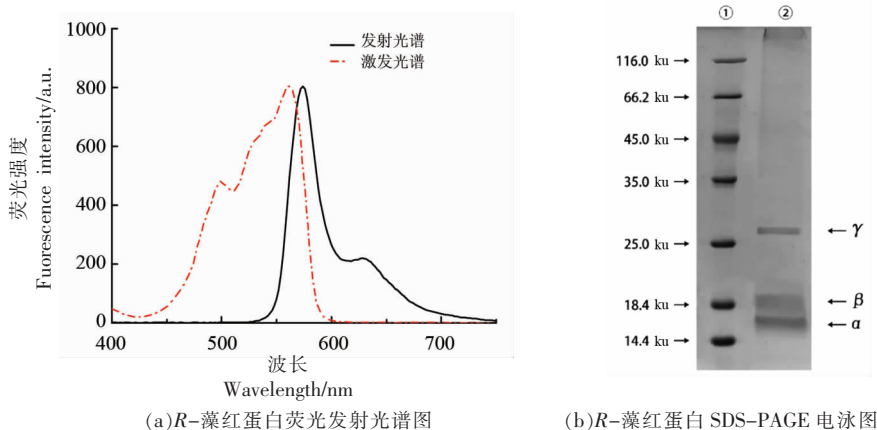


图 3 *R*-藻红蛋白的鉴定及表征

Fig.3 Identification and characterization of *R*-phycoerythrin

3.4 *R*-藻红蛋白对水产品中 Cu^{2+} 含量的检测

3.4.1 *R*-藻红蛋白荧光探针检测条件的优化

pH 值对 Cu^{2+} 检测效果的影响如图 4a 所示, 溶液 pH 值在 5.0~11 区间, 随着 pH 值的升高, 相对荧光强度逐渐增大, 当 pH 值达到 7.0 时, 其相对荧光值最大, 之后随 pH 值的升高其相对荧光强度又逐渐减弱。说明 Cu^{2+} 在 pH 值为 7.0 时对 *R*-藻红蛋白的荧光猝灭程度最大, 此时对 Cu^{2+} 的检测效果最好。这是由于 *R*-藻红蛋白的稳定性是通过其六聚体结构来维持的, 当溶剂 pH 值发生变化时, 可能会导致静电性质和蛋白质缔合过程中所涉及的氢键受到干扰, 导致发色团的结构发生变化, 从而导致 *R*-藻红蛋白的荧光强度降低^[31], 在碱性环境中这种影响更为显著^[32-33], 因此选择 pH=7.0 进行接下来的试验。

R-藻红蛋白浓度对 Cu^{2+} 检测效果的影响如图 4b 所示, 在 0.4~1.6 mg/mL 的 *R*-藻红蛋白浓度范

围内, F_0/F 随 *R*-藻红蛋白浓度的增加而增大, 到 1.2 mg/mL 时荧光强度达到最大, 之后便逐渐降低, 后继续增大蛋白浓度 F_0/F 又有上升趋势, 但仍低于 1.2 mg/mL 时的相对荧光强度, 这是由于 *R*-藻红蛋白浓度达到一定程度时, 体系中 Cu^{2+} 含量不足以较好的猝灭 *R*-藻红蛋白。因此, 选择 1.2 mg/mL 的 *R*-藻红蛋白作为检测 Cu^{2+} 的最佳浓度。

温度对 Cu^{2+} 检测效果的影响如图 4c 所示, 水浴温度在 20~35 °C 时, F_0/F 增减幅度并不显著, 此时温度对反应体系的影响不大, 但在 30 °C 时 F_0/F 达到最大。继续提高水浴温度, 可以看到 F_0/F 迅速持续上升, 但这是由于 *R*-藻红蛋白活性受温度影响较大, 高温使 *R*-藻红蛋白中的 α -螺旋数量减少, 自发解开或失去构象而变得无功能, 导致色素稳定性的丧失, 蛋白变性失活, 导致荧光逐步减弱甚至消失所致^[34]。因此, 为保证 *R*-藻红蛋白具

有较高的生物活性与较好的检测效果,选择 30 ℃ 作为检测 Cu^{2+} 的最佳检测温度。

反应时间对 Cu^{2+} 检测效果的影响如图 4d 所示,随反应时间的延长,相对荧光强度呈线性增

加,当反应超过 15 min 后,曲线的变化趋于平缓,此时说明 Cu^{2+} 与 R -藻红蛋白作用达到平衡。为了保证 R -藻红蛋白与 Cu^{2+} 进行充分的相互作用,因此,体系的最佳反应时间确定为 15 min。

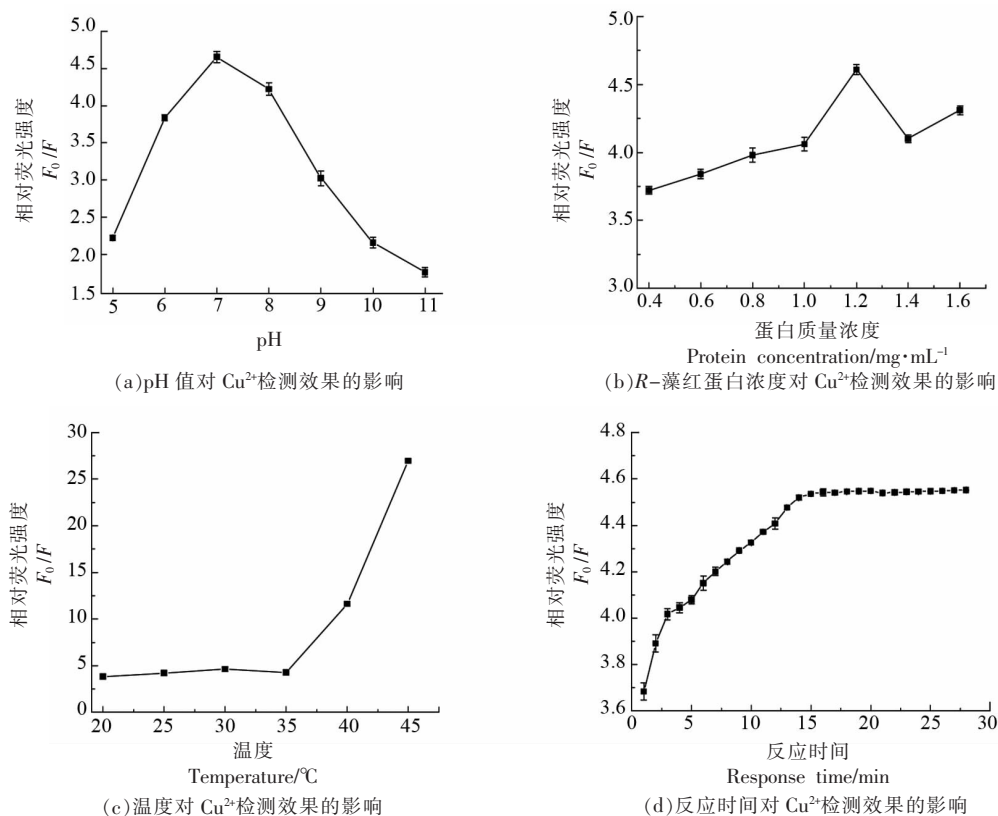


图 4 R -藻红蛋白荧光探针检测条件的优化

Fig.4 Optimization of detection conditions for R -phycoerythrin fluorescent probe

3.4.2 干扰离子对 Cu^{2+} 检测效果的影响 由表 1 可知,在相对误差在低于 5% 的情况下,考察了 9 种与食品成分相关的干扰离子对 Cu^{2+} 检测体系的影响,其中 360 倍的 Mg^{2+} 、270 倍的 K^+ 和 Na^+ 对 R -藻红蛋白荧光探针检测 Cu^{2+} 体系的荧光强度基本没有影响;6 倍的 Ca^{2+} 、1.2 倍的 Ba^{2+} 和 Zn^{2+} 对检测体系的荧光强度影响不明显;而 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Al^{3+} 对检测体系的荧光强度影响较为明显。因此,在实际检测水产品的过程应减少这些共存物质对检测体系的干扰和影响。

3.4.3 R -藻红蛋白荧光探针对 Cu^{2+} 的检测 由图 5a 可知,随 Cu^{2+} 浓度的增加,该体系在 574 nm 处的荧光值不断降低。图 5b 为相对荧光强度

表 1 金属离子对 R -PE 检测 Cu^{2+} 效果的影响
Table 1 The effect of metal ions on the detection of Cu^{2+} by R -PE

共存离子	倍数	相对误差/%
Mg^{2+}	360	4.86
K^+	270	0.79
Na^+	270	2.45
Ca^{2+}	6	3.99
Ba^{2+}	1.2	3.74
Zn^{2+}	1.2	4.36
Fe^{2+}	0.6	4.06
Pb^{2+}	0.09	4.30
Al^{3+}	0.09	1.43

(F_0/F) 和 Cu^{2+} 浓度间建立的标准曲线, 0.5~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, Cu^{2+} 浓度与 F_0/F 呈良好的线性关系。低浓度范围 (0.5~5 $\mu\text{mol/L}$), $F_0/F=0.1855C+$

0.9575, $R^2=0.9961$; 高浓度范围 (5~50 $\mu\text{mol/L}$), $F_0/F=0.0765C+1.522$, $R^2=0.9982$, 检出限分别为 0.06308 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.1530 $\mu\text{mol/L}$ 。

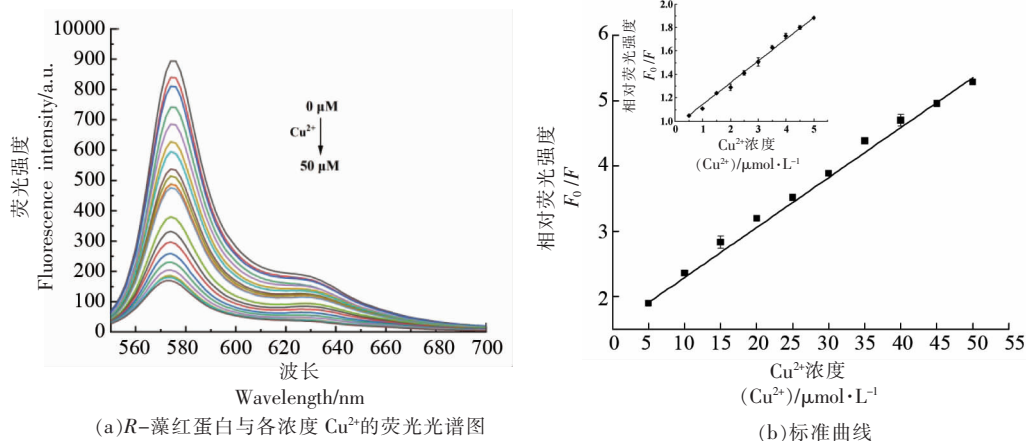


图 5 *R*-藻红蛋白荧光探针对 Cu^{2+} 的检测

Fig.5 Detection of Cu^{2+} by *R*-phycoerythrin fluorescent probe

3.5 样品检测

为证实 *R*-藻红蛋白荧光探针在实际样品中的适用性, 将此方法应用到实际水产品中 Cu^{2+} 的检测。如表 2 所示, *R*-藻红蛋白荧光探针对于实

际样品中 Cu^{2+} 的加标回收率为 94.50%~106.03%, 且 RSD 值均在 3% 以下。因此, 此方法对于实际样品的检测具有良好的适用性, 可用于检测水产品中的 Cu^{2+} 含量。

表 2 水产品中 Cu^{2+} 的加标回收结果

Table 2 The results of standard addition and recovery of Cu^{2+} in aquatic products

样品	Cu^{2+} 计算浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cu^{2+} 添加浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cu^{2+} 检测浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
虾头	3.97	2	5.86	98.16	0.6
		20	23.64	98.62	0.8
		40	43.83	99.68	1.4
虾体	0.75	2	2.85	103.64	0.4
		20	20.65	99.52	0.7
		40	41.92	102.87	2.1
金鲳鱼	—	2	1.89	94.50	0.6
		20	19.87	99.35	0.9
		40	41.23	103.08	1.5
蛤蜊	1.07	2	3.16	102.93	0.8
		20	22.34	106.03	1.2
		40	42.51	103.51	1.9

4 结论

利用纤维素酶解法提取红毛藻藻红蛋白, 通过正交优化试验得出酶解温度、酶解时间对红毛藻藻红蛋白提取效果影响较大, 提取温度为 40

$^{\circ}\text{C}$, 提取时间 5 h, 加酶量为红毛藻藻粉的 2.5% 时提取 *R*-藻红蛋白质量浓度为 43.64 mg/mL。通过饱和度为 60% 硫酸铵、DEAE Sepharose FF 柱层析两步纯化法纯化藻红蛋白, 得到纯度为 2.1

(A_{620}/A_{280}) 的药品级高纯度 *R*-藻红蛋白, 此时 *R*-藻红蛋白含有 3 个亚基, α 、 β 和 γ 亚基, 分子质量分别为 17.0, 19.0, 27.0 ku。在最佳检测条件 *R*-藻红蛋白质量浓度 1.2 mg/mL, 水浴温度 30 °C, 反应时间 15 min, 缓冲液 pH 值 7.0 时 *R*-藻红蛋白荧光探针针对 Cu^{2+} 检测效果最好, 在 0.5~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, Cu^{2+} 与 F_0/F 具有良好的线性关系, 低浓度时 $F_0/F=0.1855C+0.9575$ (0.5 $\mu\text{mol/L}$ ~5 $\mu\text{mol/L}$, $R^2=0.9961$); 高浓度 Cu^{2+} 时 $F_0/F=0.0765C+1.522$ (5 $\mu\text{mol/L}$ ~50 $\mu\text{mol/L}$, $R^2=0.9982$), 检出限分别为 0.06308 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.1530 $\mu\text{mol/L}$ 。且该方法对实际样品的检测具有良好的适用性, 回收率为 94.50%~106.03%。因此 *R*-藻红蛋白荧光探针针对水产品中 Cu^{2+} 检测方面具有潜在的应用价值, 为水产品中重金属 Cu^{2+} 检测提供了一项新的方法。

参 考 文 献

- [1] 吴靖娜, 陈晓婷, 路海霞, 等. 红毛藻营养成分分析与评价[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(6): 131-136.
WU J N, CHEN X T, LU H X, et al. Analysis and evaluation of nutritional components in bangia fusco-purpurea [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(6): 131-136.
- [2] 黄文凤, 黄建明, 董飞强, 等. 红毛菜的营养成分特征和价值[J]. 海洋水产研究, 1998, 19(2): 57-61.
HUANG W F, HUANG J M, DONG F Q, et al. Value and characteristics of the nutri entelements of bangia fusco-purpurea [J]. Progress in Fishery Sciences, 1998, 19(2): 57-61.
- [3] 纪乃茹, 李月, 姜泽东, 等. 红毛藻研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(2): 238-241.
JI N R, LI Y, JIANG Z D, et al. Advances in research on bangia fusco-purpurea [J]. The Food Industry, 2020, 41(2): 238-241.
- [4] 翦秋丽, 蒋丽刚, 严江燕, 等. 红藻糖苷抑制黑色素形成的作用研究[J]. 生物学杂志, 2017, 34(5): 39-42.
JIAN Q L, JIANG L G, YAN J Y, et al. Suppression of melanin formation by floridoside [J]. Journal of Biology, 2017, 34(5): 39-42.
- [5] 蔡薇. 红毛藻多糖组成分析、体外免疫诱导活性及抑菌活性研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018.
CAI W. Study on the composition analysis, in vitro immunostimulatory and anti-antibacterial activities of polysaccharides isolated from Bangia fusco-purpure [D]. Xiamen: Jimei University, 2018.
- [6] JIANG Z, YU G, LIANG Y, et al. Inhibitory effects of a sulfated polysaccharide isolated from edible red alga Bangia fusco-purpurea on alpha-amylase and alpha-glucosidase [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2019, 83(11): 2065-2074.
- [7] 陈小强, 史锋, 龚兴国. *R*-藻红蛋白的结构、功能及其应用[J]. 细胞生物学杂志, 2004(4): 399-403.
CHEN X Q, SHI F, GONG X Q. The Construction, function and applications of *R*-phycoerythrin [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2004(4): 399-403.
- [8] WU Q, FU X P, SUN L C, et al. Effects of physicochemical factors and in vitro gastrointestinal digestion on antioxidant activity of *R*-phycoerythrin from red algae Bangia fusco-purpurea [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(6): 1445-1451.
- [9] BATARD P, SZOLLOSI J, LUESCHER I, et al. Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: Advantages and limitations [J]. Cytometry, 2002, 48(2): 97-105.
- [10] OI V T, GLAZER A N, STRYER L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules [J]. Journal of Cell Biology, 1982, 93(3): 981-986.
- [11] SALURI M, KALDMAE M, ROSPU M, et al. Spatial variation and structural characteristics of phycobiliproteins from the red algae Furcellaria lumbricalis and Coccotylus truncatus [J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2020, 52: 102058.
- [12] YANG H, TANG Z, WANG L, et al. The reactivity study of peptide A3-capped gold and silver nanoparticles with heavy metal ions [J]. Materials Science and Engineering B-Advanced Functional Solid-State Materials, 2016, 210: 37-42.
- [13] XU Y, HOU Y, WANG Y, et al. Sensitive and selective detection of Cu^{2+} ions based on fluorescent Ag nanoparticles synthesized by *R*-phycoerythrin from marine algae Porphyra yezoensis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 168: 356-362.

- [14] LI S, CAO W, KUMAR A, et al. Highly sensitive simultaneous detection of mercury and copper ions by ultrasmall fluorescent DNA-Ag nanoclusters[J]. *New Journal of Chemistry*, 2014, 38(4): 1546-1550.
- [15] ZIETZ B P, DE VERGARA J D, DUNKELBERG H. Copper concentrations in tap water and possible effects on infant's health - Results of a study in Lower Saxony, Germany[J]. *Environmental Research*, 2003, 92(2): 129-138.
- [16] LIU X, WANG L, ZHANG N, et al. Ratiometric fluorescent silver nanoclusters for the determination of mercury and copper ions[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(19): 8019-8024.
- [17] JIANG H E, TANG D N, LI N H, et al. A novel chemosensor for the distinguishable detections of Cu^{2+} and Hg^{2+} by off-on fluorescence and ratiometric UV-visible absorption[J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 250: 119365.
- [18] WANG P, SUN L Y, WU J, et al. A dual-functional colorimetric and fluorescent peptide-based probe for sequential detection of Cu^{2+} and S^{2-} in 100% aqueous buffered solutions and living cells[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 407: 124388.
- [19] LIU M, WANG K, WANG H, et al. Simple and sensitive colorimetric sensors for the selective detection of Cu (ii)[J]. *Rsc Advances*, 2021, 11(19): 11732-11738.
- [20] YE Y, WANG L, LIU K, et al. A label-free and sensitive electrochemiluminescence sensor based on a simple one-step electrodeposition of Co/ZnS modified electrode for trace copper ions detection[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 155: 104749.
- [21] BEER S, ESHEL A. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae[J]. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 1985, 36(6): 785-792.
- [22] 张一非, 陈艳红, 伍菱, 等. 响应面优化红毛藻多糖提取工艺及抗光氧化活性[J]. *水产科学*, 2019, 38(6): 749-758.
- ZHANG Y F, CHEN Y H, WU L, et al. Optimization of polysaccharide extraction and anti-ultraviolet oxidation activity from macroalgabangia fusco-purpurea by response surface methodology[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 749-758.
- [23] 李晓燕. 美拉德反应结合罐头加工对蓝圆鲈过敏性的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- LI X Y. Effect of the maillard reaction combined with canned processing on the allergenicity of decapterus maruadsii [D]. Xiamen: Jimei University, 2015.
- [24] 陈仲玮. 章鱼新型过敏原研究[D]. 厦门: 集美大学, 2016.
- CHEN Z W. Study of the novel allergens from octopus (*octopus fangsiao*)[D]. Xiamen: Jimei University, 2016.
- [25] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中铜的测定: GB 5009.13-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Chinese National Food Safety Standard Determination of Copper in Food: GB 5009.13-2017[S]. Beijing: China Standard Press, 2017.
- [26] 张以芳, 刘旭川, 李琦华. 螺旋藻藻蓝蛋白提取及稳定性试验[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 1999, 21(3): 66-68.
- ZHANG Y F, LIU X C, LI Q H. Study on characteristic and purification of spirulina phycoerythrin [J]. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition)*, 1999, 21(3): 66-68.
- [27] ABD EL-BAKY H H, EL-BAROTY G S. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress[J]. *Food & Function*, 2012, 3(4): 381-388.
- [28] MUNIER M, MORANCAIS M, DUMAY J, et al. One-step purification of *R*-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2015, 992: 23-29.
- [29] LIU L N, CHEN X L, ZHANG X Y, et al. One-step chromatography method for efficient separation and purification of *R*-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(1): 91-100.
- [30] 王盛, 吴祖建, 林奇英, 等. 珊瑚藻藻红蛋白分离纯化技术及光谱学特性[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2002, 31(4): 495-499.
- WANG S, WU Z J, LIN Q Y, et al. Isolation and purification of phycoerythrin from *Corallina officinalis* and its spectrum characteristics[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science*

- Edition), 2002, 31(4): 495–499.
- [31] PEREIRA T, BARROSO S, MENDES S, et al. Stability, kinetics, and application study of phyco-biliprotein pigments extracted from red algae *Gracilaria gracilis*[J]. Journal of Food Science, 2020, 85(10): 3400–3405.
- [32] KAWSAR S M A J P B. Protein, *R*-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps* (Lamarck): extraction, purification and characterization[J]. Phytologia Balcanica, 2011, 17(3): 347–354.
- [33] GONZALEZ –RAMIREZ E, ANDUJAR –SANCHEZ M, ORTIZ–SALMERON E, et al. Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*[J]. Food Biophysics, 2014, 9(2): 184–192.
- [34] D’AGNOLO E, MURANO E, RIZZO R, et al. A biliprotein from the red alga *Gracilaria longa*: thermal stability of *R*-phycoerythrin[J]. The Italian journal of biochemistry, 1993, 42: 316–318.

Extraction and Purification of *R*-phycoerythrin in *Bangia fusco-purpurea* and Its Application in Cu^{2+} Detection

Cai Sixue^{1,2}, Li Yue², Wang Fang^{1*}, Jiang Zedong², Wang Li²

¹College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian

²College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian)

Abstract This paper used cellulase method to extract *R*-phycoerythrin and purified it. A fluorescence method for detecting the content of Cu^{2+} was established based on the fluorescence quenching of *R*-phythrocycin by Cu^{2+} . The results of the study showed that the concentration of *R*-phycoerythrin extracted by the cellulase method was 43.64 mg/mL when the extraction temperature was 40 °C, the extraction time was 5 hours, and the amount of enzyme was 2.5%. Purification of phycoerythrin by using 60% ammonium sulfate precipitation and DEAE Sepharose FF column to obtain pharmaceutical grade *R*-phycoerythrin with a purity of 2.1, and this *R*-phycoerythrin had good selectivity to Cu^{2+} . The best detection conditions were *R*-phycoerythrin concentration 1.2 mg/mL, water bath temperature 30 °C, reaction time 15 min, buffer pH 7.0. There was a good linear relationship between relative fluorescence intensity and Cu^{2+} concentration in the range of 0.5–50 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} , and the lowest detection limit (S/N=3) can reach 0.06308 $\mu\text{mol/L}$. This method was applied to the detection of Cu^{2+} content in actual samples, and the sample recovery rate was 94.50%~106.03%. This method has the advantages of green safety, short detection time, high sensitivity, good selectivity, Etc, and the detection of heavy metal Cu^{2+} content in aquatic products has broad application prospects.

Keywords *R*-phycoerythrin; *Bangia fusco-purpurea*; extraction and purification; fluorescent probe; Cu^{2+}