

坛紫菜 R-藻红蛋白的提取纯化及草甘膦检测应用

黄海钊, 赵逸凡, 叶庆琳, 李蒙, 吴夏冷*, 张玉苍

(集美大学海洋食品与生物工程学院 福建厦门 361021)

摘要 目的:草甘膦是一种常见的除草剂,常残留于水体中,对环境 and 人体产生危害,开发高效且准确的检测方法,测定水体中的草甘膦含量有重要意义。本研究基于坛紫菜中的 R-藻红蛋白设计一种荧光开启型探针,用于水中草甘膦的检测。方法:通过冻融循环和超声破碎提取坛紫菜中的藻红蛋白并进行纯化。肽指纹图谱、吸收光谱和 SDS-PAGE 测定结果表明,该产物为 R-藻红蛋白。本研究方法获得的 R-藻红蛋白纯度高达 4.96,达到分析纯级。进一步研究发现,提取的 R-藻红蛋白对 Cu^{2+} 离子表现出优异的特异性荧光响应性。基于该特性设计一种基于铜离子猝灭 R-藻红蛋白荧光的探针,利用草甘膦与铜离子整合的特性实现对草甘膦的检测。结果:该探针的荧光信号与草甘膦浓度呈现良好的线性关系,其最低响应值为 $443.4 \mu\text{g/L}$,远低于国标《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)中草甘膦残留物质量浓度的最大限量(0.7 mg/L)。将该探针用于 2 种实际水样中草甘膦含量的加样回收检验,检出不同含量的草甘膦。结论:本研究为高纯度 R-藻红蛋白提取提供了新思路,为检测水体中草甘膦残留提供了一种新方法,具有一定的科学意义和应用价值。

关键词 坛紫菜; R-藻红蛋白; 铜离子; 草甘膦; 加标回收

文章编号 1009-7848(2026)01-0305-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.027

草甘膦是一种较常见的有机磷除草剂之一,在控制杂草方面具有重要作用^[1]。由于草甘膦具有良好的水溶性,因此其农药残留物污染地表水和农产品问题日益突出^[2]。国际癌症研究机构(International agency for research on cancer, IARC)指出,草甘膦是潜在的致癌化合物,大量积累可能会污染环境和危害人体健康。有报道称草甘膦会引起人类疾病,如 DNA 或肾脏损伤、生殖毒性、肠漏综合征和阿尔茨海默氏症,对细胞凋亡、自噬以及细胞周期有不良影响^[3-7]。我国颁布的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)中规定,生活饮用水中草甘膦限值为 $700 \mu\text{g/L}$ 。目前,草甘膦的检测方法主要有色谱法、比色法、荧光法等^[8-11]。高效液相色谱-柱后衍生法^[12]、气相色谱-质谱法^[13]等具有灵敏度高、响应值低的优势,然而设备昂贵。二硫代氨基甲酸铜比色法^[9]是通过反应得到的黄色二硫代氨基甲酸铜配合物检测草甘膦,该方法的缺点是最低响应值较高($1.1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$)。而钼离子-

四环素荧光法^[10]使用的抗生素残留可能会影响肠道微生物菌群生长,不利于免疫系统的发育^[14],同时钼离子会污染环境^[15]。

藻红蛋白主要来源于海洋中的藻类,是重要的捕光色素蛋白。根据特征吸收光谱的不同^[16],可将藻红蛋白分为 R-藻红蛋白(R-phycoerythrin, R-PE)、B-藻红蛋白(B-phycoerythrin, B-PE)和 C-藻红蛋白(C-phycoerythrin, C-PE)。藻红蛋白中脱辅基蛋白通过半胱氨酸残基共价连接藻胆素(Phycoerythrobilin, PEB)和藻尿胆素(Phycourobilin, PUB)等色辅基团,前者作为荧光发色团使藻红蛋白呈红色荧光。藻红蛋白具有极高的商业价值和应用价值,可应用于环境污染监测、生物传感器、光动力治疗等方面,如:藻红蛋白作为荧光探针检测不同水环境中重金属离子 Hg^{2+} 含量^[17];藻红蛋白经光激发可产生氧自由基杀伤肿瘤细胞或使其凋亡^[18]等。坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)别名紫菜,属于红藻纲,紫球藻目,是我国重要的海产经济作物之一。坛紫菜中的藻红蛋白分子质量约为 240 ku ^[19],其荧光性质稳定,荧光量子产率高(82%~98%)^[20]。目前藻红蛋白提取原料以红毛藻^[21]、红胞藻^[22]和紫球藻^[23]等原料为主,然而以坛紫菜为提取原料鲜有报道,目前对坛紫菜来源的藻红蛋白性质研究不足。

收稿日期: 2025-01-21

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2021YFD2100202);福建省自然科学基金项目(2023J01770);厦门市自然科学基金项目(3502Z202372017)

第一作者: 黄海钊,男,硕士

通信作者: 吴夏冷 E-mail: xlwu@jmu.edu.cn

本研究通过冻融循环和超声破碎、凝胶色谱层析等方法,结合从坛紫菜中提取、纯化得到高纯度 R-藻红蛋白。利用 R-藻红蛋白对 Cu^{2+} 的荧光响应、草甘膦与 Cu^{2+} 的螯合作用,设计基于 R-藻红蛋白的荧光开启响应探针检测水体中草甘膦的含量。以期为水体中草甘膦的检测提供新方法,为坛紫菜资源的高值化利用开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

坛紫菜购于厦门本地超市;自来水采集于实验室,饮用矿泉水购于厦门本地超市;所有试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

CR22N 高速离心机,日本日立有限公司;EJ-410 电子天平,日本 A&D 有限公司;AKTA pure25 蛋白质纯化仪,思拓凡(美国)生命科技有限公司;NanoDrop One C 超微量分光光度计、Varioskan LUX 多功能酶标仪,赛默飞世尔科技有限公司;SCIENTZ-IIID 超声细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;FE-28 Standard pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;JASCO-815 圆二色光谱仪,日本 JASCO 公司。

1.3 方法

1.3.1 R-藻红蛋白的分离、纯化及纯度、浓度测定方法 参考余佳等^[24]的报道,设计藻红蛋白分离、纯化流程:坛紫菜干粉碎→超声波破碎提取 30 min→冻融循环 5 次→4 °C, 8 000 r/min 离心 30 min→取上清液→25%饱和硫酸铵→45%饱和硫酸铵。

45%饱和硫酸铵沉淀溶解后用 0.22 μm 滤膜过滤备用。选择 HiLoad 16/600 Superdex 200 GL 制备型凝胶色谱柱纯化,流动相为 1×PBS (pH=7.4),流速为 1 mL/min。检测波长为 260, 280, 565 nm, 收集对应峰(保留体积 12, 14, 16 mL)的流出液。保留体积 12 mL 流出峰的溶液用截留分子质量为 50 ku 的超滤管浓缩,储存于 4 °C 黑暗条件下备用。取浓缩的组分用 ddH₂O 稀释,用酶标仪扫描波长 400~700 nm 范围内的吸收光谱。SDS-PAGE 试验中,取浓缩液与 5×上样缓冲液混合后加热,待冷却后进行表征。

R-藻红蛋白的纯度 P 由波长 565 nm 处的吸光度 $A_{565\text{nm}}$ 和波长 280 nm 处的吸光度 $A_{280\text{nm}}$ 得到:

$$P = A_{565\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \quad (1)$$

藻红蛋白的质量浓度($\rho_{\text{R-PE}}$)由波长 565, 617, 650 nm 处的吸光度 $A_{565\text{nm}}$ 、 $A_{617\text{nm}}$ 和 $A_{650\text{nm}}$ 计算得到:

$$\rho_{\text{R-PE}} (\text{mg/mL}) = 0.123 \times A_{565\text{nm}} - 0.068 \times A_{617\text{nm}} + 0.015 \times A_{650\text{nm}} \quad (2)$$

1.3.2 提取物的肽图谱(Peptide mass fingerprinting, PMF) 纯化后的提取物样品在 6 mol/L 尿素、10 mmol/L 二硫苏糖醇、50 mmol/L 碳酸氢铵溶液中, 37 °C 孵育 45 min, 然后在 10 mmol/L 碘乙酰胺、50 mmol/L 碳酸氢铵溶液中黑暗条件下孵育 1 h。该溶液用 2 mol/L 尿素、50 mmol/L 碳酸氢铵稀释, 随后加入胰蛋白酶(1:40) 37 °C 过夜消化。加入 0.1% (V/V) 的甲酸停止反应。利用真空干燥器冻干样品, 然后复溶于含 0.1% 甲酸的超纯水中, 备用。

在 LC-MS/MS 检测中, 选择 100 μm×2 cm 的预柱和 75 μm×15 cm 的毛细管柱进行检测, 柱子填料为 Luna 3 μm C18 (2)。HPLC 条件为: 5%~35% B 相 60 min, 35%~75% B 相 4 min, 75% B 相 10 min (A 相: 含 0.1% 甲酸的超纯水, B 相: 含 0.1% 甲酸的乙腈), 流速 300 nL/min。检测器设置 375~1 600 m/z FT 模式。

数据分析基于 Thermo Proteome Discoverer 2.4, 从 <https://uniprot.org/> (organism="Neoporphyra haitanensis", 下载于 2022-11-24) 下载数据。腺甲基化(Cys)作为静态修饰, 氧化(Met)作为可变修饰。选择 1×10^{-5} 为精确的精度, 0.6 u 为碎片离子精度。使用 Percolator 算法验证肽图谱匹配, 基于 1% FDR 的 q 值。

1.3.3 提取纯化的 R-藻红蛋白对不同金属阳离子的响应性 将 R-藻红蛋白分别与不同金属离子 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ba^{2+}) 混合。以加入超纯水的 R-藻红蛋白作为空白对照。R-藻红蛋白的终质量浓度为 0.1 mg/mL, 不同金属离子终浓度为 100 μmol/L。用酶标仪在激发波长 498 nm, 发射波长 525~700 nm 范围内记录 R-藻红蛋白的荧光谱图。

1.3.4 R-藻红蛋白对 Cu^{2+} 的荧光响应曲线 Cu^{2+}

溶液(终质量浓度为 1.0 mg/L)加入不同浓度的 R-藻红蛋白溶液中,使 R-藻红蛋白的终质量浓度分别为 0.1,0.2,0.4,0.8,1.6 mg/mL。在 25 °C 反应 10 min 后,测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525\sim 700 \text{ nm}$ 范围内的发射光强度。

不同浓度 Cu^{2+} 加入 R-藻红蛋白溶液中,使 Cu^{2+} 的终浓度分别为 0,0.1,0.5,1.0,10.0,20.0,40.0,60.0 $\mu\text{mol/L}$,R-藻红蛋白终质量浓度为 0.1 mg/mL。在 25 °C 反应 10 min 后,在激发波长 498 nm 条件下,记录发射波长为 525~700 nm 的发射光强度。

1.3.5 基于 R-藻红蛋白的荧光探针设计 将 0.5 mg/mL 的 R-藻红蛋白分成 4 组,第 1 组 R-藻红蛋白只加 ddH₂O;第 2 组 R-藻红蛋白只加 100 μL $3\times 10^3 \mu\text{g/L}$ 的草甘膦;第 3 组 R-藻红蛋白只加 50 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu^{2+} ;第 4 组 R-藻红蛋白加 50 μL 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 100 μL $3\times 10^3 \mu\text{g/L}$ 的草甘膦。最终体积都为 250 μL 。在室温下混合 10 min,测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525\sim 700 \text{ nm}$ 范围内的发射光强度。

1.3.6 探针检测草甘膦的标准曲线和最低响应值

将不同质量浓度 (2 700,2 400,2 100,1 800,1 500,1 200,900,600 $\mu\text{g/L}$) 的草甘膦分别与 50 μL 的 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 混合于 ddH₂O 中,孵育 1 min。随后,加入 50 μL 的 R-藻红蛋白溶液,混合物的最终体积设置为 250 μL 。在室温下孵育 10 min 后,测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ 处的发射光强度记作 F_1 ,以 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 混合 R-藻红蛋白的发射光强度记作 F_0 ,计算 $\Delta F = F_1 - F_0$,以 ΔF 为纵坐标,草甘膦的浓度为横坐标绘制标准曲线。通过拟合公式计算出最低响应值(LOD),计算公式如下:

$$\text{LOD} = 3\sigma/S \quad (3)$$

式中: S 为斜率; σ 为空白标准差。

1.3.7 不同离子对探针检测 Cu^{2+} 的干扰 将 $3\times 10^4 \mu\text{g/L}$ 的金属离子 (Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ni^{2+}) 分别与 $3\times 10^3 \mu\text{g/L}$ 的草甘膦溶液混合,配制成单个金属离子混合草甘膦溶液,再将这 7 种混合溶液分别加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 0.5 mg/mL R-藻红蛋白孵育 10 min。将 $3\times 10^4 \mu\text{g/L}$ 的 7 种金属离子分别与 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 0.5 mg/mL

R-藻红蛋白溶液混合,配制成单个金属离子混合 Cu^{2+} 和 R-藻红蛋白溶液并孵育 10 min,所有混合溶液测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ 处的发射光荧光强度。

将 $3\times 10^4 \mu\text{g/L}$ 的阴离子 (Cl^- 、 NO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 Br^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 和 SO_3^{2-}) 分别与 $3\times 10^3 \mu\text{g/L}$ 的草甘膦溶液混合,配制成单个阴离子混合草甘膦溶液,再将这 7 种混合溶液分别加入 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 0.5 mg/mL R-藻红蛋白孵育 10 min。将 $3\times 10^4 \mu\text{g/L}$ 的 7 种阴离子分别与 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 和 0.5 mg/mL R-藻红蛋白的溶液混合,配制成单个阴离子混合 Cu^{2+} 和 R-藻红蛋白溶液并孵育 10 min,所有混合溶液测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ 处的发射光荧光强度。

1.3.8 水体中检测草甘膦的应用 以本研究设计的探针体系对自来水样和饮用水样中的草甘膦进行检测分析。两种水样分别用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 的微孔膜过滤,分别配制不同质量浓度 (1 500,1 200,900,600 $\mu\text{g/L}$) 的草甘膦,再将不同样品和 20 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 以及 0.5 mg/mL R-藻红蛋白混合,测量 $\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ 处的发射光荧光强度。用标准曲线计算水样中草甘膦残留物的浓度,回收率的计算方式如下:

$$\text{回收率}(\%) = A_{\text{测}}/A_{\text{添}} \times 100 \quad (4)$$

式中: $A_{\text{添}}$ 为实际添加草甘膦的浓度, $\mu\text{g/L}$; $A_{\text{测}}$ 为实际检测草甘膦的浓度, $\mu\text{g/L}$ 。

1.3.9 数据分析 本研究中关于 R-藻红蛋白的荧光性质数据处理中,均平行 3 组试验。试验结果以“平均值 \pm 标准差”表示。利用 SPSS 数据分析软件分析数据显著性。

2 结果与分析

2.1 R-藻红蛋白的分离、纯化

根据纯化流程将 45% 饱和硫酸铵沉淀组分重新溶解于 ddH₂O 中,进行凝胶色谱柱层析柱的分离、纯化,其纯化谱图如图 1a 所示。取保留体积 12 mL 组分进行吸收光谱和 SDS-PAGE 表征。吸收光谱结果显示该组分在波长 499 nm 和 565 nm 处各有 1 个峰值,并在 545 nm 处有 1 个肩峰,这是典型的 R-藻红蛋白峰形^[25];SDS-PAGE 结果表明,其组分在约 19,20,32 ku 处有明显条带,参考

文献[26]报道可能为 R-藻红蛋白的 α 、 β 和 γ 组分。为进一步确认其组成,对保留体积 12 mL 组分进行肽图谱表征,结合数据库数据分析其表征结

果。此外,经过纯化得到的藻红蛋白测试其在波长 565 nm 和 280 nm 处的吸光度 $A_{565\text{nm}}$ 和 $A_{280\text{nm}}$,纯度经计算为 4.96,达到分析纯级^[27]。

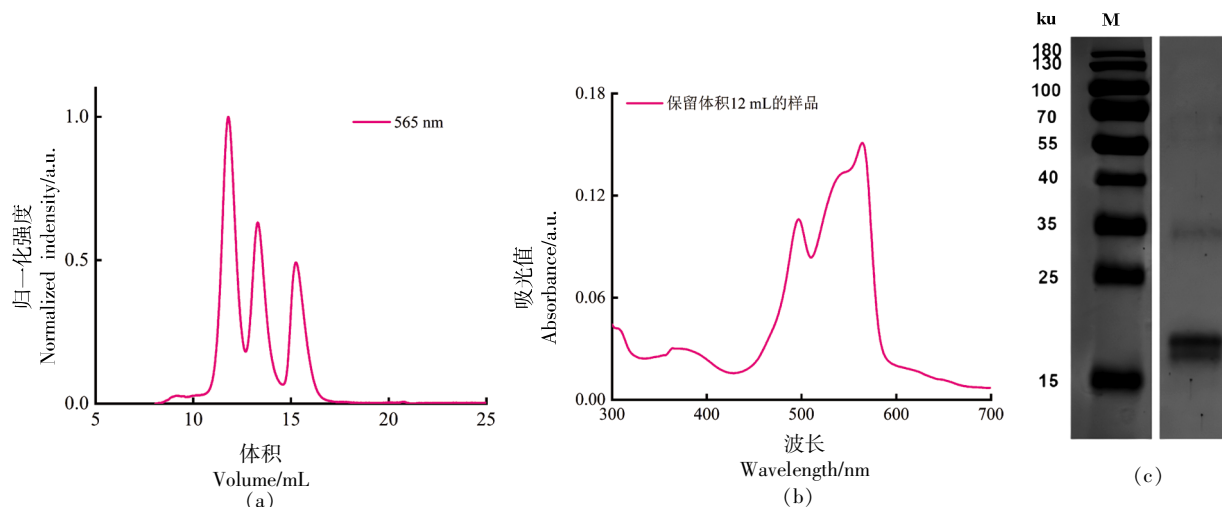


图 1 凝胶色谱柱的纯化洗脱曲线(a)、保留体积 12 mL 组分的吸收光谱(b)和 SDS-PAGE 结果(c)

Fig.1 The SEC purification result (a), the absorbance spectra (b) and SDS-PAGE(c) of content of 12 mL retention volume

2.2 提取物组分的序列分析

取分离、纯化保留体积为 12 mL 的溶液进行肽图谱表征,并在数据库中进行搜索比对。表 1 和表 2 中,序号代表蛋白编号,分数代表谱图之间相似程度,质量是蛋白质亚基的分子质量,覆盖率是相似质谱图数量的占比,指纹图谱数是质谱图数量。结果表明,该组分 α 亚基的质谱图与现有数据库中藻红蛋白 α 亚基(Q0ZHI7, UniProt)重叠率高达 80%。同理,组分的 β 亚基与藻红蛋白 β 亚基

(D6QT98, UniProt)的质谱图重叠为 58%。图 2a 中样品的 5 个显著的多肽分子质量分别为 1 151.91, 1 060.20, 886.77, 1 008.99, 1 202.11 u, 与现有的 PE α -亚基(accession-Q0ZHI7, UniProt)蛋白序列相似。同理,图 2b 中样品的 4 个肽段(1 053.06, 934.47, 1 146.60, 710.88 u)与蛋白库 PE β -亚基(accession-d6QT98, UniProt)具有相似性。结合紫外光谱图以及蛋白质序列分析结果说明该提取物为典型的 R-藻红蛋白^[28]。

表 1 提取物组分 α -亚基分析

Table 1 The analysis of substrate α -subunits

序号	分数	分子质量/u	覆盖率/%	指纹图谱数	来源
Q0ZHI7	6 247.47	17 700	80	1 466	新紫菜属 坛紫菜(<i>Neoporphyra haitanensis</i>)
Q6UDP9	22.61	17 500	24	9	新紫菜属 坛紫菜(<i>Neoporphyra haitanensis</i>)

表 2 提取物组分 β -亚基分析

Table 2 The analysis of substrate β -subunits

序号	分数	分子质量/u	覆盖率/%	指纹图谱数	来源
D6QT98	434.71	18 400	58	131	新紫菜属 坛紫菜(<i>Neoporphyra haitanensis</i>)
Q6UDP8	17.6	17 400	23	5	新紫菜属 坛紫菜(<i>Neoporphyra haitanensis</i>)



注:PMF 分析显示 α -亚基 5 个肽段(1 151.1.91, 886.77, 1 060.20, 1 008.99, 1 202.11 u), β -亚基 4 个肽段(1 053.06, 934.47, 1 146.60, 710.88 u)的氨基酸序列分别与藻胆体蛋白-PE α -亚基(accession-Q0ZHI7, UniProt)和 β -亚基(accession-D6QT98, UniProt)具有同源性。

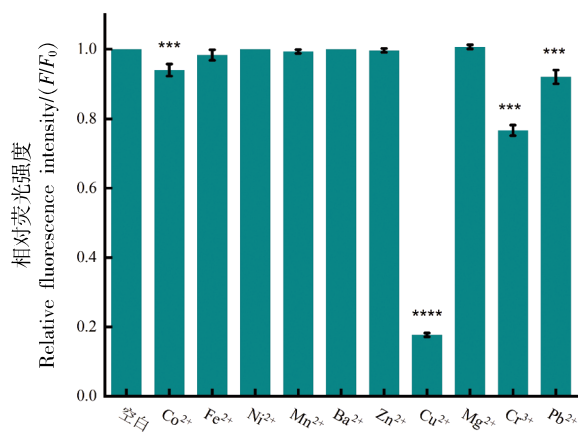
图 2 PMF 衍生的 α (a)和 β 亚基(b)

Fig.2 PMF-derived partial amino acid sequences of α (a) and β -subunit (b) of sample

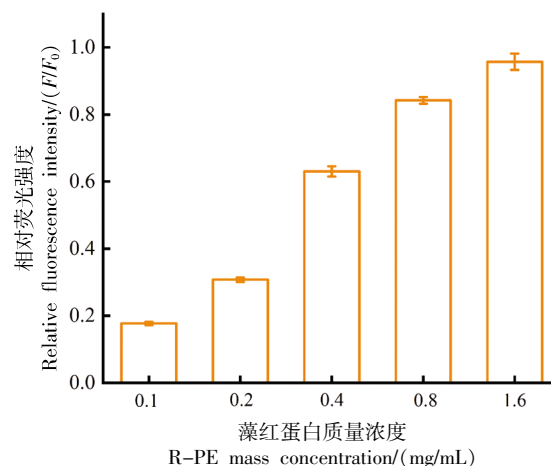
2.3 R-藻红蛋白对不同金属阳离子的响应

试验结果 2.1 节和 2.2 节均可证明从坛紫菜中成功提取了藻红蛋白,并证明该藻红蛋白的种类为 R-藻红蛋白。由提纯过程可知,R-藻红蛋白为藻红蛋白提取物的主要成分,因此选择提取的 R-藻红蛋白进行后续试验。首先检测 R-藻红蛋白对不同金属阳离子的荧光响应能力。图 3a 结果表明 Cu^{2+} 能够猝灭 R-藻红蛋白的荧光,其它金属离子对 R-藻红蛋白的荧光强度的影响微弱,甚至可以忽略不计。考虑国标《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)中饮用水铜离子的限值为 1 mg/mL,因此研究铜离子限值时,不同质量浓度的 R-

藻红蛋白(0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/mL)的荧光强度。在铜离子浓度为 1 mg/L 时,不同质量浓度的藻红蛋白的荧光猝灭效率如图 3b 所示。随着藻红蛋白质量浓度升高,相对荧光强度随之增强,这是设计草甘膦荧光探针的基础之一。最后评价 R-藻红蛋白荧光探针检测 Cu^{2+} 的能力。 Cu^{2+} 浓度的增加使 R-藻红蛋白的荧光强度降低。当 Cu^{2+} 浓度达到 60 $\mu\text{mol/L}$ 时,R-藻红蛋白的荧光光谱谱峰消失,说明 60 $\mu\text{mol/L}$ 以上的 Cu^{2+} 能几乎猝灭 R-藻红蛋白的荧光。有研究表明 Cu^{2+} 离子通过和 R-藻红蛋白荧光发色团结合,影响 R-藻红蛋白的四吡咯发色团构象变化而导致猝灭^[29]。



(a)R-藻红蛋白与 10 $\mu\text{mol/L}$ 各种金属离子的混合溶液的相对荧光强度 (F/F_0)



(b)1 mg/L Cu^{2+} 猝灭不同浓度 R-藻红蛋白的相对荧光强度 (F/F_0)

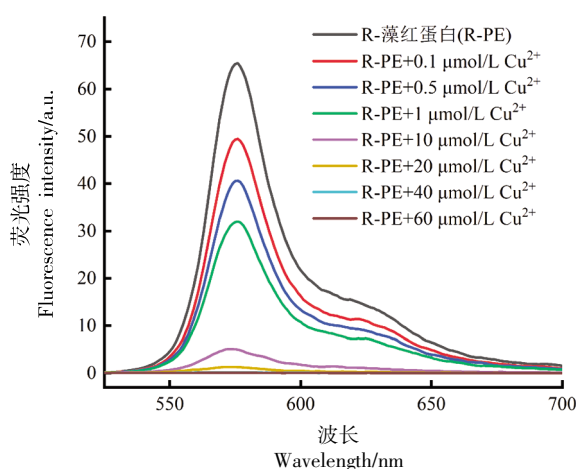
(c)不同 Cu^{2+} 浓度存在下的 R-藻红蛋白荧光光谱注:图 a 中,***, $P \leq 0.001$,****, $P \leq 0.0001$ 。

图 3 R-藻红蛋白与金属离子的荧光相互作用

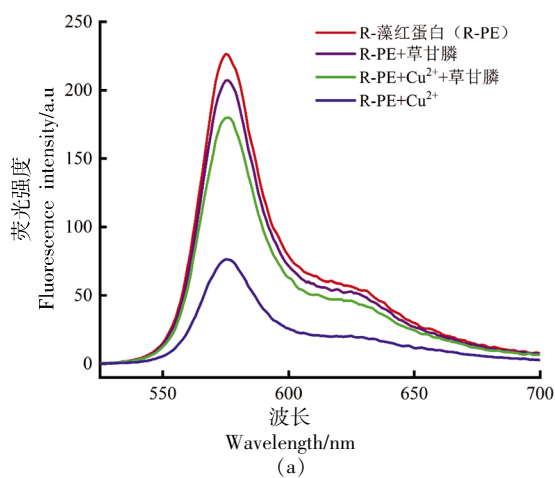
Fig.3 Fluorescent interaction between R-PE and metal ions

2.4 基于 R-藻红蛋白设计的荧光开启探针及其最低响应值

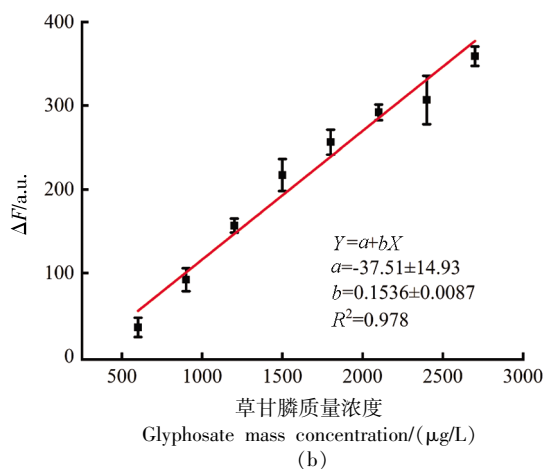
在 R-藻红蛋白对 Cu^{2+} 荧光响应良好的基础上,设计了基于 R-藻红蛋白的“关-开”式草甘膦检测探针。如图 4a 所示,在 498 nm 的激发波长下,R-藻红蛋白在 575 nm 处有 1 个发射峰,加入草甘膦后 R-藻红蛋白的荧光强度略微下降。存在 Cu^{2+} 时,R-藻红蛋白的荧光强度下降到原始荧光强度的 30%,形成荧光“关闭”状态。而添加草甘膦后 R-藻红蛋白的猝灭荧光能恢复原始荧光强度的 89.5%,形成荧光“开启”状态。有文献报道^[30-34],草甘膦可以通过螯合作用与 Cu^{2+} 相互作用:草甘

膦的羧酸酯氧、磷酸酯氧原子和单质子化的仲胺氮原子可与 Cu^{2+} 形成螯合环。该结果初步证明了基于 R-藻红蛋白的“关-开”式探针具有一定的可行性。

其次,检测草甘膦浓度与探针荧光强度的关系。如图 4b 所示,随着草甘膦质量浓度的增加, Cu^{2+} 猝灭的 R-藻红蛋白荧光强度差值(ΔF)相应增强,并具有良好的线性关系。在 600~2 700 $\mu\text{g/L}$ 范围内, ΔF 与草甘膦质量浓度呈线性检测方程为 $Y = -37.51 + 0.1536X$,相关系数 R^2 为 0.978,草甘膦的检测限(LOD)为 443.4 $\mu\text{g/L}$ 。



(a)

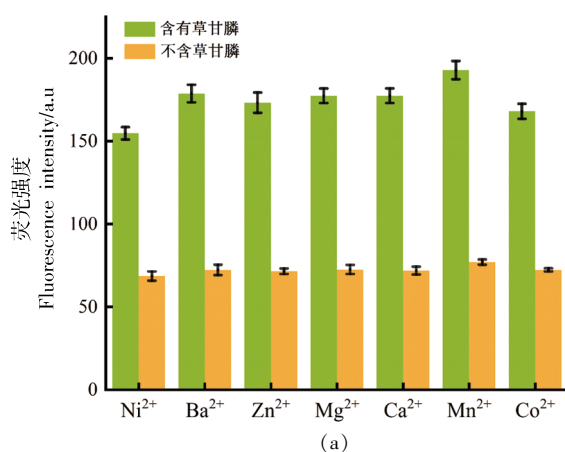


(b)

图 4 基于 R-藻红蛋白- Cu^{2+} 体系检测草甘膦Fig.4 Detection of glyphosate based on the R-PE- Cu^{2+} system

2.5 其它离子对草甘膦检测的干扰

水体中的离子成分较多,检测除 Cu^{2+} 外的其它离子对该探针的影响十分必要。如图 5a 所示,当几种金属离子(Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ni^{2+}) 以草甘膦 10 倍的浓度加入响应系统,R-藻红蛋白的荧光恢复没有受到明显影响。另一方面,



实际应用中农药残留常常伴有阴离子(如 Cl^- 、 NO_3^- 、 CO_3^{2-} 、 Br^- 、 SO_4^{2-} 、 HCO_3^- 和 SO_3^{2-} 等)进入水体,故也需检测阴离子对探针的影响。如图 5b 所示,阴离子几乎不会干扰 R-藻红蛋白对草甘膦的检测。

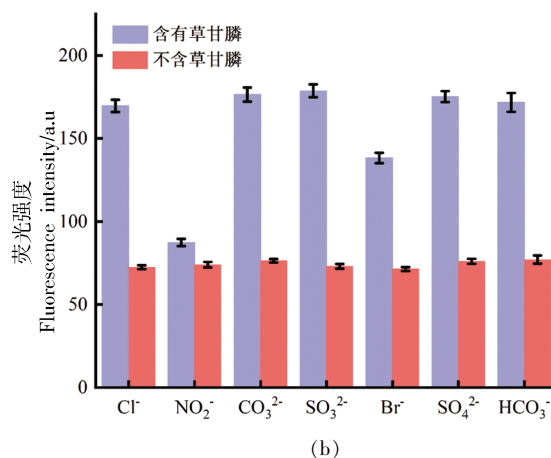


图 5 不同离子对草甘膦检测的干扰影响

Fig.5 The effect of detection glyphosate by adding different anion or cation

2.6 探针在水体中检测草甘膦及回收草甘膦的效率

为考察设计的 R-藻红蛋白荧光传感器在水体中检测草甘膦含量实际应用的可行性,以自来水和矿泉水为代表水样进行测试。采用加标回收^[35-36]法计算最终浓度,结果见表 3。自来水中草甘膦含量的回收率在 96.4%~119.0%之间。矿泉水中草甘膦含量的回收率在 107.6%~128.6%之间。结果表明,设计的荧光传感器在实际样品的草甘膦含量检测中具有良好的响应。

3 结论与讨论

本研究通过超声波细胞破碎结合冻融循环,经过硫酸铵沉淀法和凝胶色谱法纯化得到分析纯的 R-藻红蛋白。与现有的藻红蛋白 α -亚基(accession-Q0ZHI7, UniProt) 序列和 β -亚基(accession-d6QT98, UniProt) 序列匹配,其结果相似度高,验证提取物为 R-藻红蛋白。R-藻红蛋白的荧光猝灭效率和铜离子对数浓度有线性关系,R-藻红蛋白的荧光强度变化量也与草甘膦的浓度有线性关系。本研究设计的探针方法最低响应值为

表 3 水样中草甘膦含量的检测($n=3$)

Table 3 The detection of glyphosate in water samples ($n=3$)

样品	添加草甘膦的质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测草甘膦的质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	相对标准 偏差/%	回收 率/%
自来水	0	—	—	—
	600	578.2	19.4	96.4
	900	1 067.1	17.3	118.6
	1 200	1 428.5	9.2	119.0
	1 500	1 767.6	6.6	117.8
矿泉水	0	—	—	—
	600	645.5	3.1	107.6
	900	1 066.9	10.5	118.5
	1 200	1 542.8	7.7	128.6
	1 500	1 826.0	6.5	121.7

注:“—”表示未检出。

443.4 $\mu\text{g/L}$, 低于国标《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022) 饮用水中草甘膦残留物浓度的最大限量 0.7 mg/L 。最后,两种水样中草甘膦加样回收检验试验表现出良好的灵敏度和选择性。以上结果表明 R-藻红蛋白在检测金属离子和农药草甘

磷残留方面具有很大潜力,而铜离子猝灭藻红蛋白荧光的作用机理尚不清楚,将在后期工作中进一步研究。

参 考 文 献

- [1] PEREZ A L, TIBALDO G, SANCHEZ G H, et al. A novel fluorimetric method for glyphosate and AMPA determination with NBD-Cl and MCR-ALS[J]. *Spectrochimica Acta, Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 214: 119-128.
- [2] BORGGAARD O K, GIMSING A L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review[J]. *Pest Management Science*, 2008, 64(4): 441-456.
- [3] CLAIR É, MESNAGE R, TRAVERT C, et al. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels[J]. *Toxicology in Vitro*, 2012, 26(2): 269-279.
- [4] GUI Y X, FAN X N, WANG H M, et al. Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2012, 34(3): 344-349.
- [5] LEE H U, JUNG D U, LEE J H, et al. Detection of glyphosate by quantitative analysis of fluorescence and single DNA using DNA-labeled fluorescent magnetic core-shell nanoparticles[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 177: 879-886.
- [6] FORTES C, MASTROENI S, SEGATTO M, et al. Occupational exposure to pesticides with occupational sun exposure increases the risk for cutaneous melanoma[J]. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2016, 58(4): 370-375.
- [7] MYERS J P, ANTONIOU M N, BLUMBERG B, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement[J]. *Environmental Health*, 2016, 15(1): 19.
- [8] 邱慧敏, 耿金菊, 韩超, 等. 串联毛细管离子色谱法测定水中亚磷酸根、磷酸根、草甘膦和氨甲基膦酸[J]. *分析化学*, 2013, 41(12): 1910-1914.
- QIU H M, GENG J J, HAN C, et al. Determination of phosphite, phosphate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid by two-dimensional ion chromatography system coupled with capillary ion chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(12): 1910-1914.
- [9] GOMES M P, MACCARIO S, Le MANAC'H S G, et al. Comments on the "Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method"[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 340: 487-489.
- [10] 袁宁, 沈晓峰, 全红花, 等. 基于铈离子-四环素-草甘膦荧光增强体系结合分子印迹固相萃取测定环境样品中草甘膦的残留量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2024, 60(1): 15-21.
- YUAN N, SHEN X F, QUAN H H, et al. Determination of residue of glyphosate in environmental samples based on europium ion-tetracycline-glyphosate fluorescence enhancement system combined with molecular imprinted solid phase extraction[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2024, 60(1): 15-21.
- [11] 王琪, 刘瑶, 舒傲澜, 等. 改性氮化碳/铜基 MOF 纳米复合材料修饰电极对草甘膦的电化学检测研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2024, 37(3): 22-33.
- WANG Q, LIU Y, SHU A L, et al. Functionalized carbon nitride/copper-based MOF nanocomposites modified electrode for electrochemical detection of glyphosate[J]. *Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition)*, 2024, 37(3): 22-33.
- [12] 王敏, 李广益, 高慧, 等. 高效液相色谱-柱后衍生法测定水中草甘膦[J]. *食品科技*, 2017, 42(2): 295-297.
- WANG M, LI G Y, GAO H, et al. Determination of glyphosate in water by high performance liquid chromatography with post column derivatization[J]. *Food Science and Technology*, 2017, 42(2): 295-297.
- [13] 李燕虹, 王飞翔, 陈春牡, 等. 草甘膦农药残留检测方法研究进展[J]. *农产品加工*, 2017(9): 70-74.
- LI Y H, WANG F X, CHEN C M, et al. Advances in the detection methods research of glyphosate residues[J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2017(9): 70-74.
- [14] 谢晋, 陈小飞, 张敏敏, 等. 水中四环素类抗生素的污染现状及其去除技术研究进展[J]. *环保科技*, 2024, 30(2): 60-64.
- XIE J, CHEN X F, ZHANG M M, et al. Research progress in pollution status and removal technology

- for tetracycline antibiotics in water[J]. *Environmental Protection and Technology*, 2024, 30(2): 60–64.
- [15] AMER H E A, ABDELGAWAD H, MADANY M M Y, et al. Soil contamination with europium induces reduced oxidative damage in *Hordeum vulgare* grown in a CO₂-enriched environment [J]. *Plants*, 2023, 12(17): 3159.
- [16] 董硕, 姜璐瑶, 聂岩, 等. 条斑紫菜 R-藻红蛋白的分离纯化及稳定性研究[J]. *绿色科技*, 2022, 24(22): 210–214.
- DONG S, JANG L Y, NIE Y, et al. Isolation, purification and stability of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* ueda [J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2022, 24(22): 210–214.
- [17] GHOSH T, CHATTERJEE S, BHAYANI K, et al. A natural cyanobacterial protein C-phycoerythrin as an Hg²⁺ selective fluorescent probe in aqueous systems[J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44(16): 6601–6609.
- [18] 庄严, 谭慧心, 董彦宏, 等. 新型光敏剂藻红蛋白在肿瘤光动力治疗中的研究进展[J]. *北京联合大学学报(自然科学版)*, 2015, 29(4): 55–59.
- ZHUANG Y, TAN H X, DONG Y H, et al. Advance of phycoerythrin as a new photosensitizer in photodynamic therapy of tumors[J]. *Journal of Beijing Union University (Natural Sciences)*, 2015, 29(4): 55–59.
- [19] 王广策, 邓田, 曾呈奎. 藻胆蛋白的研究概况 (I)——藻胆蛋白的种类与组成[J]. *海洋科学*, 2000(2): 22–25.
- WANG G C, DENG T, ZENG C K. Outlines of studies on phycobiliproteins (I)-kinds and composition of phycobiliprotein [J]. *Marine Sciences*, 2000(2): 22–25.
- [20] 臧帆, 秦松, 马丞博, 等. 藻类特有的捕光色素蛋白——藻红蛋白的结构、功能及应用[J]. *科学通报*, 2020, 65(7): 565–576.
- ZANG F, QIN S, MA C B, et al. Structure, function and applications of phycoerythrin: A unique light harvesting protein in algae [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2020, 65(7): 565–576.
- [21] 蔡思学, 李月, 王芳, 等. 红毛藻 R-藻红蛋白的提取纯化及在 Cu²⁺检测中的应用[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(9): 276–284.
- CAI S X, LI Y, WANG F, et al. Extraction and purification of R-phycoerythrin in *Bangia fusco*-purea and its application in Cu²⁺ detection [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(9): 276–284.
- [22] 董硕, 蒲洋, 聂岩, 等. 红胞藻藻红蛋白的分离纯化及稳定性研究[J]. *食品科技*, 2023, 48(4): 230–236.
- DONG S, PU Y, NIE Y, et al. Isolation, purification and stability of phycoerythrin from *Rhodomonas* sp. [J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(4): 230–236.
- [23] 陈晓倩, 刘永宏, 黄炳耀. 基于机械搅拌式光照发酵罐的紫球藻高产藻红蛋白培养条件优化[J]. *广西科学*, 2020, 27(5): 541–545.
- CHEN X Q, LIU Y H, HUANG B Y. Culture conditions optimization for high-yield of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* based on a light fermentation tank with mechanical agitator [J]. *Guangxi Sciences*, 2020, 27(5): 541–545.
- [24] 余佳, 赵岚, 张瑞华, 等. 葛仙米藻胆蛋白的提取工艺优化及其纯化研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(2): 82–89.
- YU J, ZHAO L, ZHANG R H, et al. Research on optimization of phycobiliprotein extraction from *Nostoc sphaeroids* Kutzing and the purification of phycobiliprotein [J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(2): 82–89.
- [25] ULAGESAN S, NAM T J, CHOI Y H. Extraction and purification of R-phycoerythrin alpha subunit from the marine red algae *Pyropia yezoensis* and its biological activities [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6479.
- [26] SATHUVAN M, THANGAM R, VENKATESHBABU G, et al. Single-step purified R-phycoerythrin transmits cellular imaging functionalities *in vitro* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 563–570.
- [27] ZANG F, QIN S, MA C B, et al. Preparation of high-purity R-phycoerythrin and R-phycoerythrin from *Pyropia yezoensis* in membrane chromatography [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(5): 3411–3418.
- [28] PATEL S N, SONANI R R, JAKHARIA K, et al. Antioxidant activity and associated structural attributes of *Halomicronema* phycoerythrin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 359–369.

- [29] SIMOVIC A, COMBET S, CIRKOVIC V T, et al. Probing the stability of the food colourant R-phycoerythrin from dried nori flakes[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131780.
- [30] DANIELE P G, DE STEFANO C, PRENESTI E, et al. Copper (II) complexes of *N*-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution: A thermodynamic and spectrophotometric study[J]. Talanta, 1998, 45(2): 425-431.
- [31] SHEALS J, PERSSON P, HEDMAN B. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper (II) complexes of glyphosate in aqueous solution[J]. Inorganic Chemistry, 2001, 40(17): 4302-4309.
- [32] YANG Y X, GHALANDARI B, LIN L Y, et al. A turn-on fluorescence sensor based on Cu²⁺ modulated DNA-templated silver nanoclusters for glyphosate detection and mechanism investigation[J]. Food Chemistry, 2022, 367: 130617.
- [33] ZHENG F, HE J T, LI Y M, et al. A novel and ultrasensitive fluorescent probe derived from labeled carbon dots for recognitions of copper ions and glyphosate[J]. Spectrochimica Acta, Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 287(2): 122052.
- [34] WAN C Q, PANG Y H, ZHAI Y S, et al. Ratio fluorescence test strip visualized by amino-functionalized metal-organic framework for rapid sensing of glyphosate[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2023, 297: 122673.
- [35] WANG X B, FANG Z S, LI Z Y, et al. R-phycoerythrin proteins@ZIF-8 composite thin films for mercury ion detection[J]. Analyst, 2019, 144(12): 3892-3897.
- [36] PACKIRISAMY V, AYYADURAI B, PERUMAL D, et al. Green synthesis of R-phycoerythrin protected gold nanoclusters for sensitive detection of mercury (II) ions and their antibacterial properties[J]. Journal of Materials Research, 2023, 38(11): 3009-3021.

The R-Phycoerythrin Extracted and Purified from *Porphyra haitanensis* and the Application of Detecting Glyphosate

HUANG Haizhao, ZHAO Yifan, YE Qinglin, LI Meng, WU Xialing*, ZHANG Yucang
(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian)

Abstract Objectives: Glyphosate was an efficient herbicide, while there was negative impact on water environment and human health. Therefore, it is significant to develop an efficient and accurate method to detect the glyphosate in water. In this study, a fluorescent turn-on probe was designed based on R-phycoerythrin in *Porphyra haitanensis* for detection of glyphosate in water. Methods: The crude extract in *P. haitanensis* was extracted by freeze-thaw cycle and ultrasonication. The peptide mass fingerprint, absorbance spectrum and SDS-PAGE indicated the extract was R-phycoerythrin. The purity of R-phycoerythrin was as high as 4.96 after purification. Further studies indicated the R-phycoerythrin was specific fluorescence responded to Cu²⁺ ions. A fluorescent probe based on the copper ion quenching R-phycoerythrin fluorescence was designed. Results: The probe fluorescence signal showed good linear relationship with the glyphosate concentration, and the detection limit was 443.4 μg/L, which was significantly lower than the maximum allowable residue limit (0.7 mg/L) specified for glyphosate in the Chinese National Standard for Drinking Water Quality (GB 5749—2022). The probe was used to detect the glyphosate content in two water samples and the glyphosate was tested. Conclusions: The study not only highly-value utilized of *P. haitanensis*, but also provides a new method for the detection of glyphosate residues in water, which has certain scientific significance and application value.

Keywords *Porphyra haitanensis*; R-phycoerythrin; copper ion; glyphosate; spike recovery test