DOI:10.12441/spyswjs.20240617001 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0163-10

重组靛蓝色素合成酶快速定量检测*L*-谷氨酰胺

袁天慧[1] 李 晗[2] 张怡婷[1] 赵 钰[1] 成 琦[1] 韩雨洁[1] 徐得磊[1,3]
朱天择[1,2] 罗 兵[1,3] 朱益波[1,3*]

(1. 常熟理工学院生物与食品工程学院,江苏 苏州 215500; 2. 芝诺(苏州)生物科技有限公司,江苏 苏州 215500; 3. 常熟理工学院江苏省高值化合物绿色生物制造工程研究中心,江苏 苏州 215500)

摘要:【目标】快速、经济且准确地检测复杂样品中*L*-谷氨酰胺(*L*-glutamine, Gln)的浓度。【方法】利用重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达的靛蓝色素合成酶(blue pigment synthetase A,BpsA),开发快速精确定量Gln的方法。通过对脱辅基BpsA(apo-BpsA)进行体外活化及测定条件优化获得BpsA全酶(holo-BpsA)。【结果】所获holo-BpsA可在适宜条件下于30 min内完成对Gln的定量测定,该方法检测限为10.46 μmol/L,定量限为31.68 μmol/L,板间标准偏差为1.41 μmol/L,板内标准偏差为0.85 μmol/L;针对5种常用培养基的平均加标回收率为94.7%~106.6%,其标准偏差基本在5%以下。holo-BpsA在−20 ℃下保存2个月后,酶活力未见显著变化。【结论】作者开发的基于BpsA快速检测Gln的方法操作简便、专一性强、耗时短,具有较高灵敏度和准确度。

关键词:*L*-谷氨酰胺;靛蓝色素合成酶;快速定量检测

Rapid Quantitation of *L*-Glutamine Based on Recombined Blue Pigment Synthetase A

YUAN Tianhui[1] *LI Han*[2] *ZHANG Yiting*[1] *ZHAO Yu*[1] *CHENG Qi*[1] *HAN Yujie*[1] *XU Delei*[1,3]
ZHU Tianze[1,2] *LUO Bing*[1,3] *ZHU Yibo*[1,3*]

(1. School of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Suzhou 215500, China; 2. Zeno (Suzhou) Biotechnology Co., Ltd., Suzhou 215500, China; 3. Jiangsu Engineering Research Center of High-Value Compound Green Biomanufacturing, Changshu Institute of Technology, Suzhou 215500, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of this study is to determine the concentration of *L*-glutamine (Gln) in complex samples rapidly, economically, and accurately. [**Method**] A method for the rapid and precise quantification of Gln was developed based on the blue pigment synthetase A (BpsA) expressed by recombinant *Escherichia coli* (*E.coli*). The holoenzyme holo-BpsA was obtained by activating apo-BpsA *in vitro* and optimizing the measurement conditions. [**Result**] The obtained holo-BpsA can complete quantitative determination within 30 min under suitable conditions. The method showed the limit of detection being 10.46 μmol/L, the limit of quantification being 31.68 μmol/L, the interplate standard deviation of 1.41 μmol/L, and the intraplate standard deviation of 0.85 μmol/L. The average spiked recovery rate for five commonly used culture media varied between 94.7% and 106.6%, with the standard deviation mostly below 5%. There was no significant change in the enzyme activity after holo-BpsA was stored at −20 ℃ for two months. [**Conclusion**] The method developed for rapid quantitation of Gln based on BpsA is simple to operate, highly specific, and time-saving and has high sensitivity and accuracy.

Keywords: *L*-glutamine; blue pigment synthetase A; rapid quantitation

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(22208027);苏州市科技创新项目(SNG2022059);常熟市关键核心技术攻关项目(CS202305)。

通信作者:朱益波(1980—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事微生物合成研究。E-mail:centuryrain@126.com

收稿日期:2024-06-17 **修回日期:**2024-09-19

Gln在生物医药产业的细胞培养、临床治疗中危重病人肠外营养补充，以及食品制造产业中保健食品和特医食品等方面具有广泛应用[1-2]。在细胞培养方面，无血清细胞培养中多种细胞对Gln存在依赖性。例如，在杂交瘤细胞培养过程中，当Gln浓度为0时，细胞将快速死亡。Gln在生物制造、组织工程的细胞培养中必不可少，且需根据监测结果及时补充[3]。在临床应用领域，Gln已被证明具有刺激免疫应答[4-5]、保护肠道屏障[5-6]、促进细胞增殖[7-8]等生物学功能，既可以用于治疗急性胰腺炎[9-10]、镰刀形细胞贫血病[11]等疾病，也可配合营养支持促进烧伤、重度创伤等病情恢复[12]，还可能作为肿瘤细胞增殖和转移的潜在治疗靶点[13-14]，为攻克癌症提供新的方向[15-16]。在食品领域，运动员通过摄入Gln运动补充剂，缓解运动疲劳并促进机能恢复[17-18]；患者通过使用含有Gln的特殊医学用途配方食品，补充营养以促进术后修复[12,19]。然而，目前对Gln的研究尚不够充分，实际应用中仍存在诸多挑战，例如细胞培养基中过量的Gln会抑制其他氨基酸的转运[3]，危重病人Gln的补充需要控制在理想浓度，患有Gln依赖性肿瘤的病人需要精确控制摄入量等[20]。2022年发布的《食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则》（草案）中，针对常见非全营养组件的技术指标专门增加了Gln、精氨酸等成分的标准。综上所述，在细胞培养、临床药品使用与病人生理指标监测、食品质量控制等方面，快速且准确对Gln进行定量检测具有重要意义。

现有的Gln定量分析方法主要包括电位滴定法、高效液相色谱法、试剂盒比色法和酶膜电极法。电位滴定法对仪器要求低且操作简单，但只适用于高纯度Gln的快速检测，对于组分复杂的细胞培养液、食品样品和体液检测结果偏差较大[21]；高效液相色谱法需要进行衍生化处理[22-23]，存在操作复杂、前处理时间长等问题，不适合快速定量分析；酶膜电极法需要配合生化分析仪使用，尽管检测响应速度快，但需要昂贵的专用设备和酶膜组件，且复杂样品可能存在不确定的干扰；目前市场主流的Gln快速分析试剂盒产品主要为谷氨酰胺酶和谷氨酸脱氢酶的组合[15]，其步骤复杂、辅因子多、处理时间长，易受谷氨酸等干扰且价格高昂。例如某品牌销售的GLN1试剂盒需要8种不同的试剂和多个孵育步骤，单个样品的直接检测费用超过50元。因此，基于新的测定原理开发性价比更高、过程更快捷和结果更精准的Gln定量分析方法具有重要意义。

薰衣草链霉菌（*Streptomyces lavendulae*）的BpsA能够定量转化Gln为高摩尔消光系数的靛蓝色素。该酶属于非核糖体肽合成酶，apo-BpsA在体内通过4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶（PPTase）将辅酶A（coenzyme A，CoA）转移到肽载体域（PCP），形成有活力的holo-BpsA[24]，见图1。作者以*E. coli* BL21（DE3）为宿主分别构建了BpsA及其活化酶PPTase的重组菌株，探究了apo-BpsA的体外活化条件，研究了holo-BpsA催化Gln合成靛蓝色素的影响因素，并优化了体外催化反应和检测条件。同时，对检测方法的应用范围和检测效果进行了分析比较。本研究中建立的快速定量检测Gln的方法耗时短、专一性强，且具有更优的灵敏度和检测范围，为开发复杂样品Gln快速定量检测试剂盒产品奠定了基础。

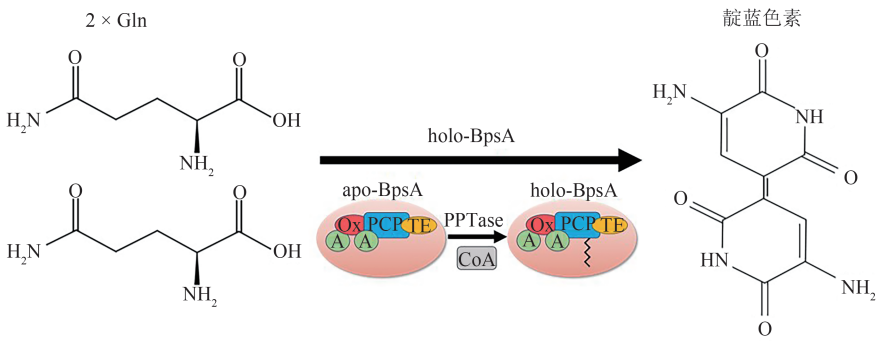


图1 BpsA催化Gln合成靛蓝色素

Fig. 1 BpsA catalyzes the synthesis of indigo pigment from Gln

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　菌株、质粒及引物

E. coli BL21（DE3）、*E. coli* DH5α：作者所在实验室保藏，*E. coli* BL21（DE3）pET22b-*pcpS*、*E. coli* BL21（DE3）pCDFDuet-*bpsA*：本研究中构建；质粒pEKEX2-*bpsA*：芝诺（苏州）生物科技有限公司保存；pET22b-*pcpS*：通用生物（安徽）股份有限公司合成；pCDFDuet-1：作者所在实验室保存；pCDFDue-*bpsA*：本研究中构建。

引物bpsA-F（CCGCGGATCCGACCTTGCAGGAGACTAGCG，下划线为*Bam*H I酶切位点）和bpsA-R（CCCGGTCGACTCACTCACCGAGAAGGTAACG，下划线为*Sal* I酶切位点）用于扩增*bpsA*和重组质粒pCDFDue-*bpsA*测序验证，pcpS-F（ATGCGTGCAATGAATGATC）和pcpS-R（TTATGCACCCACTGCCACC）用于重组菌株和质粒pET-22b-*pcpS*的验证，上述引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2　主要试剂

CHO MaxX CHO培养基：上海迈邦生物科技有限公司；Dynamis™ AGT™培养基：赛默飞世尔科技（中国）有限公司；Eden B600S培养基：上海倍谙基生物科技有限公司；OPM-AM08 DPM培养基：上海奥浦迈生物科技股份有限公司；LB培养基（NaCl 10 g/L、胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L），蛋白质提取缓冲液（20 mmol/L咪唑、0.5 mol/L $MgCl_2$、体积分数12.5%甘油、20 mmol/L Tris-Cl，pH 7.8），0.1 mol/L PBS（82.4 mmol/L Na_2HPO_4、17.6 mmol/L KH_2PO_4、1.37 mol/L NaCl、26.8 mmol/L KCl，pH 7.2~7.4），蛋白质纯化缓冲液A（500 mmol/L NaCl、50 mmol/L PBS，pH 8.0），蛋白质纯化缓冲液B（500 mmol/L NaCl、50 mmol/L PBS，500 mmol/L咪唑、pH 8.0），反应缓冲液A（20 mmol/L $MgCl_2$、6 mmol/L ATP、50 mmol/L Tris-Cl，pH 8.5），反应缓冲液B（20 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L ATP、100 mmol/L Tris-Cl，pH 8.5）：生工生物工程（上海）股份有限公司。

T4 DNA连接酶、DNA限制性内切酶（*Sal* I和*Bam*H I）：宝日医生物技术（北京）有限公司；蛋白质Marker、DNA Marker、Taq Plus Master Mix、Phanta Max Master Mix：南京诺唯赞生物科技股份有限公司；氨苄青霉素、壮观霉素、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、二甲基亚砜（DMSO）、Gln、谷氨酸、氯化镍、氯化铜、硫酸亚铁、硫酸铁、乙二胺四乙酸（EDTA）、十二烷基硫酸钠（SDS）、吐温-80：生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2　仪器与设备

高效蛋白质纯化工作站：ÄKTA Purifier UPC10型，美国通用电气集团有限公司；光吸收全波长酶标仪：Readmax1900型，上海闪谱生物科技有限公司；台式高速冷冻离心机：HR/T20M型，湖南赫西仪器装备有限公司；多功能水平电泳槽：HE-120型，上海天能生命科学有限公司；微型垂直电泳槽：VE-180型，上海天能生命科学有限公司；数显式稳压稳流电泳仪：EPS-300型，上海天能生命科学有限公司；振荡培养箱：MQD-B3NR型，上海旻泉仪器有限公司；超声波细胞破碎仪：XO-1000型，南京先欧仪器制造有限公司；紫外可见分光光度计：UV-1800PC型，上海美谱达仪器有限公司；全自动高压蒸汽灭菌器：PHM-70L型，上海尧勋智能科技有限公司；电子天平：ME104E型，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；精密pH计：EL20型，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；PCR仪：GM-05型，力康生物-力新仪器（上海）有限公司；电热恒温鼓风干燥箱：DHG-9030A型，上海一恒科学仪器公司。

1.3　方法

1.3.1　载体与菌株构建

使用引物bpsA-F和bpsA-R，以pEKEX2-*bpsA*为模板扩增*bpsA*基因片段；限制性内切酶*Sal* I和*Bam*H I对pCDFDuet和PCR产物分别进行双酶切，用琼脂糖凝胶DNA胶回收试剂盒回收目标片段，T4 DNA连接酶连接目标片段与载体，将连接产物转化至*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，经PCR验证和测序验证后获得重组菌株*E. coli* BL21（DE3）pCDFDuet-*bpsA*。将合成的pET-22b-*pcpS*质粒直接转入感受态细胞*E. coli* BL21（DE3）中并进行PCR验证，获得*E. coli* BL21（DE3）pET-22b-*pcpS*。

1.3.2　apo-BpsA与PPTase表达

将重组菌株单菌落分别接种于LB培养基（含100 mg/L氨苄青霉素或壮观霉素）中，37 ℃、200 r/min过夜培养，取1 mL菌液接种至200 mL LB培养基中，同样条件下培养至OD_{600}值达到0.5~0.6时加入终浓度0.05 mmol/L的IPTG，16 ℃继

续培养16 h。诱导后的培养物于4 ℃、4 000 r/min离心10 min，收集菌体。对照组菌株培养条件与试验组一致，但未添加IPTG。

1.3.3 holo-BpsA体外制备

将1.3.2收集的菌体重悬于20 mL蛋白质提取缓冲液中，冰水浴条件下超声破碎细胞10 min，超声4 s间隔6 s，4 ℃、10 000 r/min离心20 min，分别获得重组*apo*-BpsA及PPTase粗酶液，取上清液于4 ℃保存待用。为确定PPTase体外活化apo-BpsA最优体积比，按照PPTase与*apo*-BpsA粗酶液体积比分别为1∶60、1∶40、1∶20、1∶10、1∶5，取相应体积的PPTase上清液加到100 μL apo-BpsA中，对照组以蒸馏水代替PPTase，加蒸馏水至总体积为200 μL，随后各加入5 μL 30 mmol/L CoA混合均匀，30 ℃孵育20 min，获得不同比例活化后的holo-BpsA粗酶液。在96孔板中加入30 μL反应缓冲液与30 μL 1.0 mmol/L Gln，混合均匀后加入30 μL holo-BpsA启动催化反应，使用酶标仪在30 ℃条件下实时记录20 min内的OD_{610}值变化，测定holo-BpsA的反应初速度。酶活力定义为：在30 ℃、pH 8.5的条件下，每秒OD_{610}值增加0.001所需的酶量为1个酶活力单位。

1.3.4 holo-BpsA纯化

为便于纯化holo-BpsA，在重组BpsA的N端添加了6×His标签。通过3倍柱体积的蛋白质纯化缓冲液A以平衡Ni Focurose 6FF（IMAC）亲和层析柱。holo-BpsA粗酶液经0.22 μm滤膜过滤，按照线速度1 cm/min上样，上样完成后以同样线速度进行洗脱，调整蛋白质缓冲液B比例，先用30 mmol/L咪唑洗脱杂质，OD_{280}值下降至稳定后，调整到100 mmol/L咪唑洗脱目标蛋白质，根据洗脱峰收集目标蛋白质，随后调整咪唑浓度至500 mmol/L洗涤10个柱体积，过程中根据洗脱峰收集目标蛋白质。使用SDS-PAGE检测各馏分。

1.3.5 holo-BpsA体外催化条件优化

由于holo-BpsA体外催化Gln合成的靛蓝色素不溶于水，且易被还原为无色的水溶性隐色体盐，为便于开发灵敏的定量分析方法，对holo-BpsA体外催化时间、温度、靛蓝色素DMSO溶解时间和DMSO终体积分数进行优化。过程如下：在1.5 mL离心管中加入30 μL反应缓冲液和30 μL holo-BpsA，混合均匀后添加30 μL 1.0 mmol/L的Gln，在不同条件下进行反应或溶解，分别探究holo-BpsA的最佳催化时间、催化温度、DMSO体积分数、DMSO溶解时间。体外催化条件优化设置的基本参数为：催化时间20 min，反应温度30 ℃，DMSO终体积分数80%，200 r/min振荡10 min。优化时分别设置催化时间为10、15、20、25 min；催化温度为20、25、30、35、40 ℃；DMSO终体积分数为50%、60%、70%、80%、85%；振荡溶解时间为5、10、15、20、30、40 min。反应结束后使用酶标仪检测OD_{610}值，所有检测均设置3组平行，以蒸馏水作为空白对照。

1.3.6 Gln检测标准曲线

使用蒸馏水配制5 000 μmol/L Gln，经梯度稀释分别获得2 500、1 250、625、312、156 μmol/L的Gln。在96孔板中加入10 μL反应缓冲液和10 μL holo-BpsA，混合均匀后分别加入10 μL上述不同浓度的Gln作为底物，40 ℃催化反应20 min后各添加120 μL DMSO至终体积分数80%，酶标仪上振荡溶解20 min。检测OD_{610}值，以蒸馏水作为空白对照，试验结果以平均值±均值标偏差表示，以Gln浓度和吸光度为横纵坐标绘制标准曲线。

1.3.7 方法灵敏度和精密度分析

使用蒸馏水分别配制200、400、600、800 μmol/L的Gln溶液备用。在离心管中分别加入反应缓冲液B 15 μL和holo-BpsA 15 μL，混合均匀后分别加入15、30、45 μL不同浓度的Gln底物，使酶与底物的体积比分别为1∶1、1∶2、1∶3，40 ℃催化反应20 min后，取200 μL反应产物转移至96孔板中，按照1.3.3中测定holo-BpsA反应初速度的方法测定酶活力，以Gln浓度和吸光度为横纵坐标绘制标准曲线。通过多次空白测定和平行及重复试验，计算该方法的检测限、定量限，并用板间和板内标准偏差表示精密度，以标准曲线斜率比较不同比例的灵敏度。检测限和定量限的计算公式[25]分别为：

$$D_{LO}=\frac{3.3\delta}{S}, \tag{1}$$

式中：

D_{LO}——检测限；

δ——空白组的标准偏差；

S——标准曲线斜率。

$$Q_{LO}=\frac{10\delta}{S} \tag{2}$$

式中：

Q_{LO}——定量限；

δ——空白组的标准偏差；

S——标准曲线斜率。

1.3.8　检测方法准确度分析

方法准确度通过真实样品的加标回收率分析进行衡量。本研究选用实际生产和研究中常用的动物细胞和细菌培养基作为模拟的复杂生物样品。在2组离心管中分别加入CHO Max X CHO Production Medium、DynamisTMAGTTMMedium、DrivingM®Eden B600S、OPM-AM08 DPM、LB培养基各500 μL，其中一组离心管中加入等体积蒸馏水混匀，另一组加入等体积1.0 mmol/L Gln作为加标样品。各取30 μL，添加反应缓冲液30 μL和holo-BpsA 30 μL于离心管中混匀，40 ℃催化反应20 min后添加DMSO至终体积分数80%，溶解20 min后检测OD_{610}值，计算加标回收率。

1.3.9　潜在干扰因素分析

针对样品中可能存在的金属离子、表面活性剂及谷氨酸，作者对检测过程潜在的干扰因素进行了分析。将1.0 mmol/L的氯化镍、氯化铜、硫酸亚铁、硫酸铁、EDTA、SDS、吐温-80和谷氨酸分别与1.0 mmol/L Gln等体积混匀，取30 μL至96孔板中，添加反应缓冲液30 μL和holo-BpsA 30 μL，按照1.3.3中测定holo-BpsA反应初速度的方法测定酶活力；将蒸馏水与1.0 mmol/L Gln等体积混匀作为空白对照，计算各干扰因素下holo-BpsA的相对酶活力。

1.3.10　holo-BpsA酶活稳定性分析

将纯化的holo-BpsA在−20 ℃条件下保存，分别在第1、4、8周按照1.3.3中测定*holo*-BpsA反应初速度的方法测定酶活力，并以该酶的初始酶活力为基准计算holo-BpsA的相对酶活力。

1.3.11　数据分析

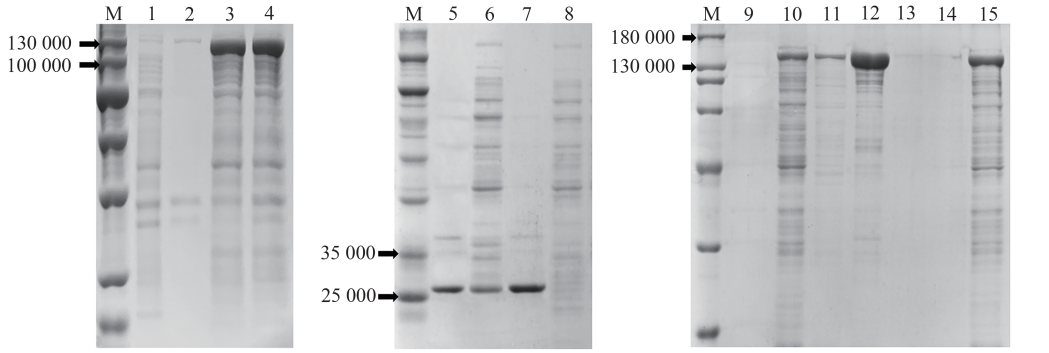
使用Excel 2019和GraphPad Prism整理数据，采用t检验进行显著性分析，$P<0.05$表示差异显著，用不同小写字母标注；$P\geq0.05$表示差异不显著，用相同小写字母标注。数据用平均值±标准偏差表示（n=3）。

2　结果与讨论

2.1　BpsA与PPTase重组表达载体构建和表达优化

靛蓝色素合成酶BpsA是一种非核糖体肽合成酶，经过PPTase活化后，在体内外能够将2个Gln分子转化为具有高摩尔消光系数的靛蓝色素产物[26]，因此可通过该酶促反应产物的吸光度快速测定样品中Gln的浓度。目前，已经发现多种不同来源的PPTase可以激活BpsA，其中铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）表达的PcpS蛋白的效果更好[27]。

作者将构建的*E. coli* BL21（DE3）pCDFDuet-*bpsA*和*E. coli* BL21（DE3）pET-22b-*pcpS*进行诱导表达，如图2（a）和（b）所示，经过SDS-PAGE验证，最终在大肠杆菌中实现BpsA和PcpS重组蛋白的高效异源表达，其中BpsA相对分子质量为141 000，主要分布于细胞破碎上清液中，PcpS相对分子质量为26 700，在上清液和沉淀中均有分布。使用Ni Focurose 6FF（IMAC）亲和层析柱对holo-BpsA粗酶液



M—蛋白质Marker；
1—对照组破碎全菌样；
2—试验组沉淀样；
3—试验组上清液样；
4—试验组全菌样。

(a) *E. coli* BL21(DE3) pCDFDuet-*bpsA* 蛋白质诱导表达结果

M—蛋白质Marker；
5—试验组沉淀样；
6—试验组上清液样；
7—试验组全菌样；
8—对照组破碎全菌样。

(b) *E. coli* BL21(DE3) pET-22b-*pcpS* 蛋白质诱导表达结果

M—蛋白质Marker；
9—流穿液1；10—流穿液2；
11—体积分数6%蛋白质纯化缓冲液B洗脱；
12—体积分数20%蛋白质纯化缓冲液B洗脱；
13—体积分数50%蛋白质纯化缓冲液B洗脱；
14—体积分数100%蛋白质纯化缓冲液B洗脱；
15—holo-BpsA粗酶液。

(c) holo-BpsA蛋白质纯化结果

图2　重组蛋白表达与纯化

Fig. 2　Expression and purification of recombinant proteins

进行纯化，根据洗脱峰收集目标蛋白质，SDS-PAGE结果显示，100 mmol/L咪唑即可完成洗脱，获得holo-BpsA纯化蛋白质，见图2(c)。

2.2　holo-BpsA的活化

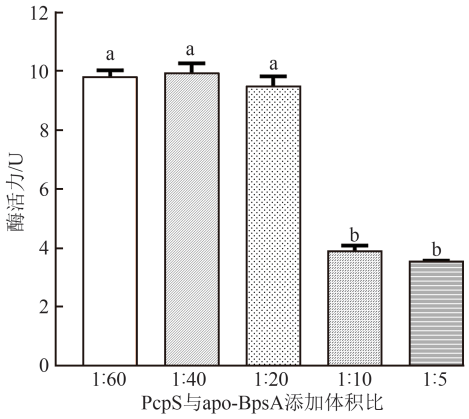
非活性形式的apo-BpsA需经过PPTase活化成为holo-BpsA，才具有催化Gln合成靛蓝色素的功能，在这个过程中，需要补充辅酶A作为磷酸泛酰巯基乙胺(4'-phosphopantetheine，PPT)的来源。使用holo-BpsA粗酶液进行酶促反应试验，离心管中无色透明的反应液迅速变蓝并逐渐形成沉淀，然后缓慢褪色，表明活化得到的holo-BpsA具有催化Gln合成靛蓝色素的活性，在体外能维持其生物学功能。

为了确定最佳活化比例，控制各试验组apo-BpsA的用量一致，使用不同比例的PPTase和PcpS重组细胞裂解液进行活化。动力学检测结果显示，PcpS的催化效率非常高，少量的酶即可快速完成apo-BpsA的活化，其中PcpS与apo-BpsA添加体积比为1∶40时，holo-BpsA酶活力达到最高(见图3)，降低PcpS的添加量，holo-BpsA仍能保持较高的酶活力。过量添加PcpS会导致其催化能力降低，可能与酶促反应时底物与酶碰撞机会减少有关。

2.3　holo-BpsA催化条件优化

催化时间、催化温度是影响酶催化反应的重要因素。在一定范围内，适当延长催化时间可以提高催化活性，但是过长的催化时间也可能导致产物还原为隐色体，影响显色测定；在一定限度内，酶的活性会随着温度的升高而增加，但过高的温度可能导致酶失活。如图4所示，催化时间为20 min时，OD_{610}值达到最高。随着反应温度升高，OD_{610}值持续增加，未表现出高温失活的特性，综合考虑生物检测实验室的常规反应条件与样品的耐受温度，选择40 ℃作为holo-BpsA的催化温度。

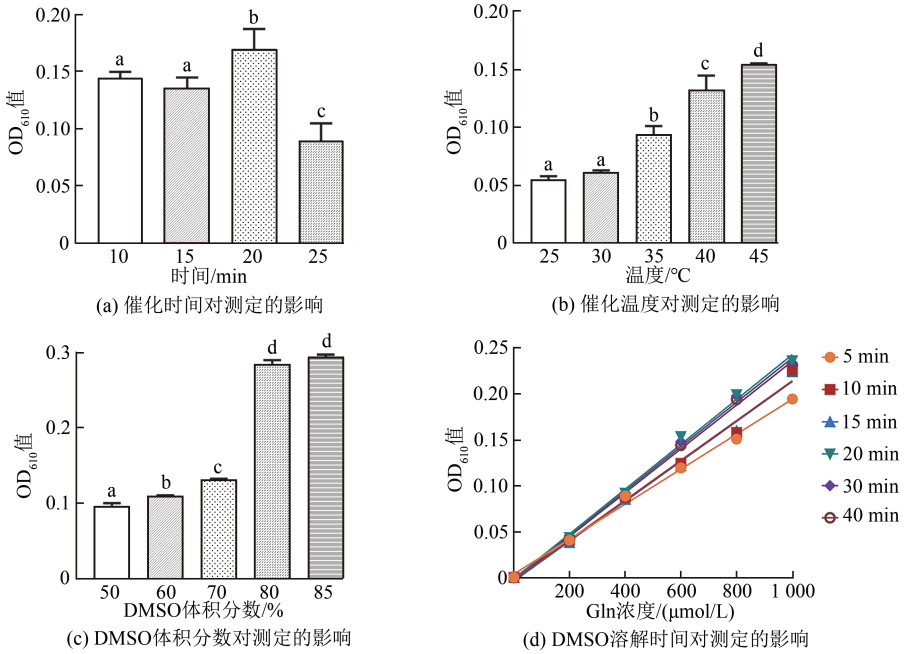
靛蓝色素在水中溶解度较低，反应过程中可



图中不同字母表示各组结果差异显著(P<0.05)；相同字母表示各组结果差异不显著(P≥0.05)。

图3　holo-BpsA制备条件优化

Fig. 3　Optimization of preparation conditions for *holo*-BpsA



(a) 催化时间对测定的影响　(b) 催化温度对测定的影响

(c) DMSO体积分数对测定的影响　(d) DMSO溶解时间对测定的影响

图中不同字母表示各组结果差异显著(P<0.05)；相同字母表示各组结果差异不显著(P≥0.05)。

图4　holo-BpsA催化条件优化

Fig. 4　Optimization of catalytic conditions for holo-BpsA

见明显的蓝色沉淀。靛蓝色素可溶于部分有机试剂，如DMSO、四氢呋喃（THF）、N-甲基吡咯烷酮（NMP）和二甲基甲酰胺（DMF）等。作者选择常见且安全性较高的DMSO作为溶剂，探究其体积分数和溶解时间对催化反应检测结果的影响。结果显示，DMSO体积分数为80%时的溶解效果可以满足试验需求，且在溶解时间为20 min时，Gln标准曲线的斜率最大，溶解效果最佳。

此外，考虑到提高反应体系中样品的比例有助于提高检测方法的灵敏度，作者进一步研究了在相同酶用量的情况下，不同测试样品的加样量对检测灵敏度的影响。结果表明，增加测试样品的加样量显著提高了Gln标准曲线的斜率，说明其检测灵敏度明显升高（见图5）。综合考虑96孔板的工作体积和DMSO溶剂的影响，采用酶与检测样品体积比为1∶2较为合适。

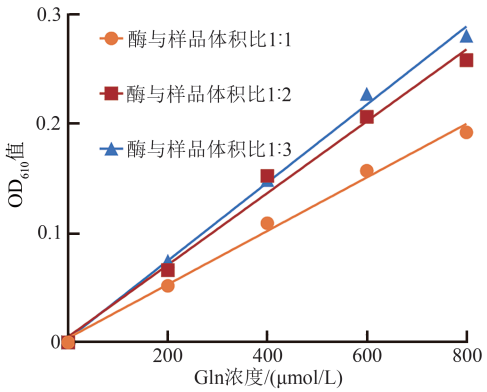


图5　检测方法灵敏度

Fig. 5　Sensitivity of the quantitation method

按照1.3.6绘制*holo*-BpsA测定Gln的标准曲线（见图6）。在5 000 μmol/L以内，标准曲线拟合为三次方曲线；在1 250 μmol/L以内，标准曲线拟合为线性，R^2>0.99。

2.4　holo-BpsA检测Gln的方法性能分析

为评估holo-BpsA检测Gln的最低浓度、精密度和灵敏度，测定了优化后方法的检出限、定量限、板内标准偏差、板间标准偏差和精密度。结果显示，空白组的标准偏差为0.78 μmol/L，标准曲线斜率为0.25，经1.3.7中的公式（1）和公式（2）计算分别得到检出限为10.46 μmol/L，定量限为31.68 μmol/L，板内标准偏差为0.85 μmol/L，板间标准偏差为1.41 μmol/L。

作为动物细胞和细菌培养基中必需但不稳定的添加剂，Gln的准确定量分析至关重要，因此作者选择了5种常用培养基进行Gln加标检测。holo-BpsA进行样品检测的平均加标回收率为94.7%~106.6%，且标准偏差基本在5%以下（见表1），表明本检测方法准确度较高，能够准确定量不同培养基中的Gln水平。

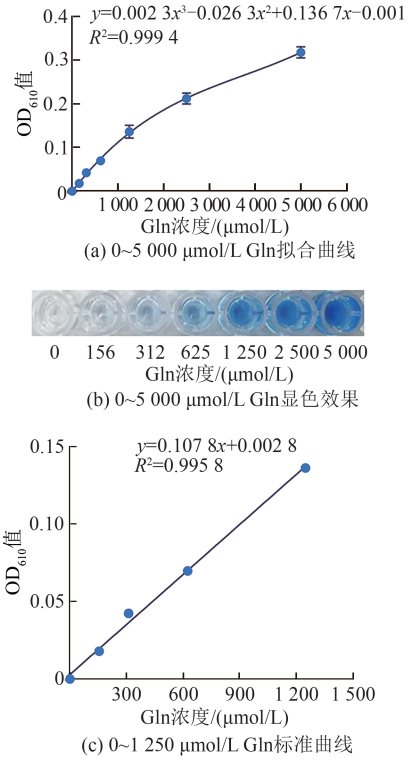


图6　holo-BpsA测定Gln标准曲线

Fig. 6　Standard curve for determining Gln by holo-BpsA

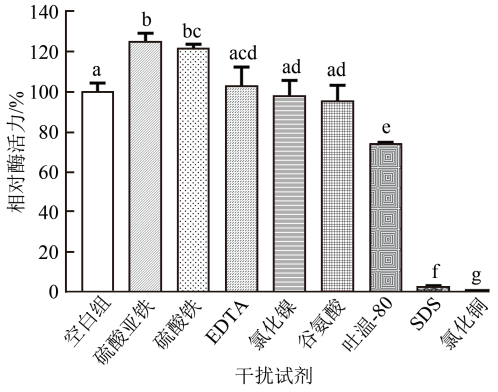
表1　holo-BpsA定量测定复杂样品的加标Gln

Table 1　Quantitative measurement of Gln in spiked complex samples based on holo-BpsA

培养基商品名	平均加标回收率/%	标准偏差/%
CHO MaxX CHO培养基	94.7	7.7
Dynamis™ AGT™ 培养基	106.6	2.0
Eden B600S培养基	102.5	3.4
OPM-AM08 DPM培养基	95.3	3.5
LB培养基	101.9	3.8

为进一步探究本方法检测Gln浓度的潜在干扰，减少检测误差，作者进一步分析了对定量检测Gln可能产生影响的干扰因素。与未添加任何干扰试剂的对照组相比，在反应液中添加氯化镍、EDTA和谷氨酸对试验数据未产生显著影响。添加1 mmol/L硫酸亚铁或硫酸铁时，相对酶活力稍有提高。然而，目前尚无文献表明硫酸亚铁或硫酸铁能

够促进BpsA的酶活力，因此，相对酶活力提高可能因为金属离子的引入导致表观吸光度发生变化。添加1 mmol/L氯化铜和SDS后，反应液中几乎检测不到相对酶活力，这可能是因为1 mmol/L的氯化铜和SDS强烈抑制了其酶活力，最终导致holo-BpsA失去催化能力（见图7）。



图中不同字母表示各组结果差异显著（P<0.05）；相同字母表示各组结果差异不显著（P≥0.05）。

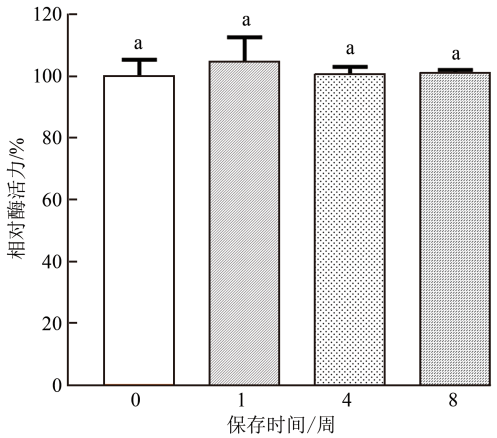
图7　holo-BpsA催化反应干扰性因素分析

Fig. 7　Effects of interference factors on holo-BpsA catalytic reaction

作者进一步探究了holo-BpsA的稳定性，为其可能的保存期提供依据。holo-BpsA纯化酶于−20 ℃条件下保存于体积分数50%甘油溶液中。在第1、4、8周时，相对酶活力与初始状态相比均无显著差异（见图8），表明该纯化酶在常规的低温保存条件下具有良好的稳定性，且适合较长时间保存。

2.5　holo-BpsA检测方法应用比较

相较于现有主流产品，本研究中开发的holo-BpsA快速定量检测Gln的方法在原理和应用效果上具有明显优势。如表2所示，与主流的市售Gln快速测定试剂盒相比，本检测方法从原理上避免了谷氨酸等常见干扰物对检测结果的影响，测定流程更为简单直接，有效降低了检测时间和经济成本，明显提高了检测方法的精密度，且具有更高的准确度和灵敏度以及更宽的测定范围。



图中相同字母表示各组结果差异不显著（P≥0.05）。

图8　holo-BpsA保存稳定性

Fig. 8　Stability of holo-BpsA

表2　主流市售试剂盒与本方法比较

Table 2　Comparison between commercially available kits and this method

编号	名称及型号	检测方法	售价/（百次/元）	技术指标	适用样品	参考来源
1	Glutamine Assay Kit MAK438	利用谷氨酰胺酶水解Gln为谷氨酸，通过测定谷氨酸计算Gln含量；检测耗时40 min	5 755	线性范围0.023~2.000 mmol/L	体液、细胞、组织	［28］
2	谷氨酰胺含量检测试剂盒BC5305	谷氨酰胺酶和谷氨酸脱氢酶催化Gln生成α-酮戊二酸、NADH和NH_4^+，在1-mPMS作用下，WST与NADH反应，检测OD_{450}值计算Gln含量；检测耗时125 min	6 400	未提供	体液、细胞、组织	［29］
3	Glutamine Assay	检测原理与编号1产品相同；检测耗时90 min	7 816	灵敏度25 μmol/L	体液、细胞、组织	［30］
4	Glutamine Assay Kit-WST G268	检测原理与编号2产品相同；检测耗时45 min	6 060	未提供	未明确	［31］
5	谷氨酰胺含量测定试剂盒	检测原理与编号1产品相同；检测耗时50 min	3 200	线性范围100~600 μg/mL	发酵液、组织	［32］
6	holo-BpsA快速定量检测Gln	holo-BpsA催化Gln生成高摩尔消光系数的化合物，直接测定OD_{610}值；检测耗时30 min	预估950	线性范围0.03~1.25 mmol/L	发酵液、细胞培养液等	本研究

3 结论

作者提供了一种较现有Gln检测试剂盒更为精准且快速的定量检测方法，即基于holo-BpsA将Gln高度专一性地快速合成为靛蓝色素，通过测定该产物的OD_{610}值实现快速定量。作者通过在大肠杆菌中分别表达apo-BpsA及其活化酶PPTase，优化了apo-BpsA的体外活化条件，并在此基础上确定了96孔板中holo-BpsA检测Gln的最佳方案。在优化的检测条件下，方法的检测限、定量限、精确度、准确度和灵敏度分析结果表明，该检测方法具有方便快捷、精确度高、灵敏度高、体系稳定、抗干扰性强等优点。

参考文献

[1] 兰天艳，马桂兰，王娟，等. 谷氨酰胺影响细胞培养的研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医，2018，48(10)：25-28.
LAN T Y，MA G L，WANG J，et al. Research progress of glutamine affecting cell culture[J]. Gansu Animal Husbandry and Veterinary，2018，48(10)：25-28.(in Chinese)

[2] 周淼. 谷氨酰胺运动补剂对篮球运动员体能恢复的促进作用[J]. 食品研究与开发，2023，44(3)：235-236.
ZHOU M. The promoting effect of glutamine exercise supplement on physical recovery of basketball players[J]. Food Research and Development，2023，44(3)：235-236.(in Chinese)

[3] YANG H，IERAPETRITOU M G，ROTH C M. Effects of amino acid transport limitations on cultured hepatocytes [J]. Biophysical Chemistry，2010，152(1)：89-98.

[4] 林涛，鄢涛，巫金. 谷氨酰胺联合早期肠内营养治疗重症急性胰腺炎的临床疗效[J]. 中国社区医师，2023，39(15)：24-26.
LIN T，YAN T，WU J. Clinical efficacy of glutamine and early enteral nutrition in treatment of severe acute pancreatitis [J]. Chinese Community Doctors，2023，39(15)：24-26.(in Chinese)

[5] 何金鑫，肖克敏，贺斌，等. 益生菌联合谷氨酰胺强化肠内营养干预对直肠癌患者根治术后创伤应激反应的影响[J]. 临床合理用药杂志，2022，15(24)：103-105.
HE J X，XIAO K M，HE B，et al. The effect of probiotics combined with glutamine enhanced enteral nutrition intervention on post-operative traumatic stress response in patients with rectal cancer undergoing radical surgery[J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use，2022，15(24)：103-105.(in Chinese)

[6] 杨奕轩，陈青怡. 谷氨酰胺强化肠内营养支持应用于老年晚期胃癌病人治疗中的有效性观察[J]. 数理医药学杂志，2022，35(11)：1723-1725.
YANG Y X，CHEN Q Y. Efficacy of glutamine intensive enteral nutrition support in elderly patients with advanced gastric cancer [J]. Journal of Mathematical Medicine，2022，35(11)：1723-1725.(in Chinese)

[7] KIM G W，LEE D H，JEON Y H，et al. Glutamine synthetase as a therapeutic target for cancer treatment[J]. International Journal of Molecular Sciences，2021，22(4)：1701.

[8] SHANG M，CAPPELLESSO F，AMORIM R，et al. Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration [J]. Nature，2020，587(7835)：626-631.

[9] 黎顺松. 谷氨酰胺应用于急性重症胰腺炎患者对其机体炎症反应影响的前瞻性研究[J]. 中外医疗，2022，41(32)：6-9.
LI S S. Prospective study on the effect of glutamine application in patients with acute severe pancreatitis on their organismal inflammatory response [J]. China & Foreign Medical Treatment，2022，41(32)：6-9.(in Chinese)

[10] YANG G，XIA Y Y，REN W K. Glutamine metabolism in Th17/treg cell fate：applications in Th17 cell-associated diseases[J]. Science China-Life Sciences，2021，64(2)：221-233.

[11] SADAF A，QUINN C T. *L*-glutamine for sickle cell disease：knight or pawn?[J]. Experimental Biology and Medicine，2020，245(2)：146-154.

[12] DE WAELE E，MALBRAIN M L N G，SPAPEN H. Nutrition in sepsis：a bench-to-bedside review [J]. Nutrients，2020，12(2)：395.

[13] 高兰，龙世棋，陈博鑫，等. 还原型谷胱甘肽靶向氧化应激对肝癌干细胞的作用[J]. 临床与实验病理学杂志，2020，36(8)：887-892.
GAO L，LONG S Q，CHEN B X，et al. Reduced glutathione supplement targets oxidative stress and restricts the stemness of hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology，2020，36(8)：887-892.(in Chinese)

[14] MENGA A，FAVIA M，SPERA I，et al. N-acetylaspartate release by glutaminolytic ovarian cancer cells sustains protumoral macrophages [J]. EMBO Reports，2021，22(9)：e51981.

[15] 刘雪柔，杨玉梅，赵倩，等. 谷氨酰胺代谢相关蛋白在肿瘤转移中的作用研究进展[J]. 中国癌症杂志，2024，34(1)：97-103.
LIU X R，YANG Y M，ZHAO Q，et al. Research progress on the role of glutamine metabolism-related proteins in tumor metastasis[J]. China Oncology，2024，

34(1):97-103.(in Chinese)

[16] JIN J, BYUN J K, CHOI Y K, et al. Targeting glutamine metabolism as a therapeutic strategy for cancer [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2023, 55(4): 706-715.

[17] RAMEZANI AHMADI A, RAYYANI E, BAHREINI M, et al. The effect of glutamine supplementation on athletic performance, body composition, and immune function: a systematic review and a meta-analysis of clinical trials [J]. Clinical Nutrition, 2019, 38(3): 1076-1091.

[18] 乔郅钠,吕青兰,李翔飞,等. 理性代谢工程改造促进谷氨酸棒杆菌高效合成*L*-谷氨酰胺[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(8):65-74.
QIAO Z N, LYU Q L, LI X F, et al. Efficient synthesis of *L*-glutamine by *Corynebacterium glutamicum* promoted *via* rational metabolic engineering[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(8): 65-74.(in Chinese)

[19] 彭洁,曹猛,孙慕涵,等. 谷氨酰胺代谢在机体免疫调控中作用的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变,2023,35(3):231-235.
PENG J, CAO M, SUN M H, et al. Research progress on the role of glutamine metabolism in immune regulation of the body [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2023, 35(3): 231-235.(in Chinese)

[20] EKICI S, NYE J A, NEILL S G, et al. Glutamine imaging: a new avenue for glioma management [J]. American Journal of Neuroradiology, 2022, 43(1): 11-18.

[21] 何宇芬,邱佩丽,张冬妮,等. 电位滴定法测定酱中氨基酸态氮含量的不确定度评定[J]. 食品安全导刊,2021(24):82-84.
HE Y F, QIU P L, ZHANG D N, et al. Evaluation of uncertainty in determination of amino acid nitrogen content in sauce by potentiometric titration [J]. China Food Safety Magazine, 2021(24): 82-84.(in Chinese)

[22] PETTERSSON L, RYDÉN S, SMEDBERG M, et al. Validation of a point-of-care instrument for bedside glutamine screening in the intensive care unit [J]. Clinical Nutrition, 2017, 36(1): 186-190.

[23] 王霞,张伟国. 发酵液中*L*-谷氨酰胺的定性定量测定[J]. 食品与生物技术学报,2008,27(6):111-114.
WANG X, ZHANG W G. Qualitative and quantitative determination of *L*-glutamine in broth [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2008, 27(6): 111-114.(in Chinese)

[24] GHIFFARY M R, PRABOWO C P S, SHARMA K, et al. High-level production of the natural blue pigment indigoidine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for sustainable fabric dyes[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021, 9(19): 6613-6622.

[25] 范志颖,王奇,吴益淳,等. 酶解-柱前衍生UPLC法检测特医食品中天冬酰胺及谷氨酰胺[J]. 中国测试,2023,49(11):127-131.
FAN Z Y, WANG Q, WU Y C, et al. Enzymatic hydrolysis pre-column derivatisation UPLC method for the detection of asparagine and glutamine in FSMP[J]. China Measurement & Test, 2023, 49(11): 127-131.(in Chinese)

[26] BROWN A S, ROBINS K J, ACKERLEY D F. A sensitive single-enzyme assay system using the non-ribosomal peptide synthetase BpsA for measurement of *L*-glutamine in biological samples[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 41745.

[27] OWEN J G, COPP J N, ACKERLEY D F. Rapid and flexible biochemical assays for evaluating 4'-phosphopantetheinyl transferase activity [J]. Biochemical Journal, 2011, 436(3): 709-717.

[28] Glutamine Assay Kit[EB/OL].(2021-11)[2024-05-25]. https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/product/sigma/mak438.

[29] 谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒[EB/OL].[2024-05-25]. https://www.solarbio.com/goodsInfo?id=152806.

[30] Glutamine Assay Kit (Colorimetric)[EB/OL](2023-06-01)[2024-05-25]. https://www.abcam.cn/products/assay-kits/glutamine-assay-kit-colorimetric-ab197011.html.

[31] Glutamine Assay Kit-WST [EB/OL] (2019-09-26)[2024-05-25]. https://www.dojindo.cn/#/goodsDetails?gid=631.

[32] 谷氨酰胺含量测定试剂盒(比色法)[EB/OL][2024-05-25]. http://www.yajimall.com/product/detail/13682.html.

(责任编辑:龚梦月)