



利用工程化芳基硫酸酯酶水解顽固性甾体

Amanda C. McGee* • Linda L. Grimes • [Anusha Chaparala](#) • L. Andrew Lee • Caleb R. Schlachter

Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc., Irmo, South Carolina

*Corresponding Author Contact: Amanda.McGee@imcstips.com

引言

- 硫酸基是合成代谢类固醇（AAS）主要的 II 相代谢排泄标记之一。
- 硫酸基团可通过酸解或硫酸酯酶水解。
 - 酸解可能导致分析物降解或增加基质干扰。
 - 目前市面上大多数硫酸酯酶制剂或存在杂质污染，或对相关合成代谢类固醇活性极低乃至无活性。
- 我们已开发出新型硫酸酯酶变体，相较于我们自有的硫酸酯酶产品 Sulfazyme™ PaS 以及文献中报道的其他硫酸酯酶变体，其对顽固性合成代谢类固醇的活性显著更高。

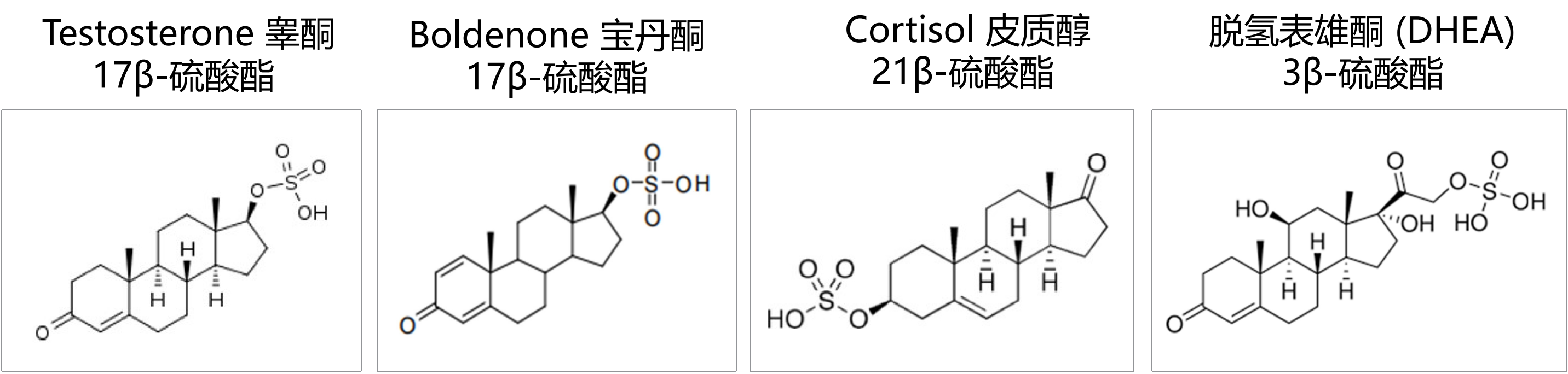


图 1. 四种常通过 LC-MS/MS 定量的硫酸化类固醇化学结构

材料与方法

Sulfazyme™ PaS（来自IMCS）是源自铜绿假单胞菌的野生型芳基硫酸酯酶。Sulfazyme™ PaS、变体 1 和变体 2，以及文献中报道的变体 PaS-PVFV (1) 和 PaS-LEF (1)，均在大肠杆菌中重组表达、纯化，并在无药物尿液对照品（UTAK）中进行体内比较。在无药物尿液（DFU）中，添加了四种不同浓度的硫酸化类固醇代谢物（表1）。采用 10 分钟液相色谱梯度分离非硫酸化类固醇（图2）。

脱氢表雄酮（DHEA）3β-硫酸酯和睾酮 17β-硫酸酯未能完全分离，因此未展示硫酸化类固醇结果。为每种分析物建立六点校准曲线，并采用线性拟合。质控样品的测定值在目标值的 ±20% 标准偏差范围内，相关系数均 ≥0.98。

表 1. 添加至无药物尿液中的硫酸化类固醇近似浓度

Steroid	Concentration (ng/mL)
Boldenone	80 ng/mL
Dehydroepiandrosterone (DHEA)	8000 ng/mL
Cortisol	400 ng/mL
Testosterone	130 ng/mL

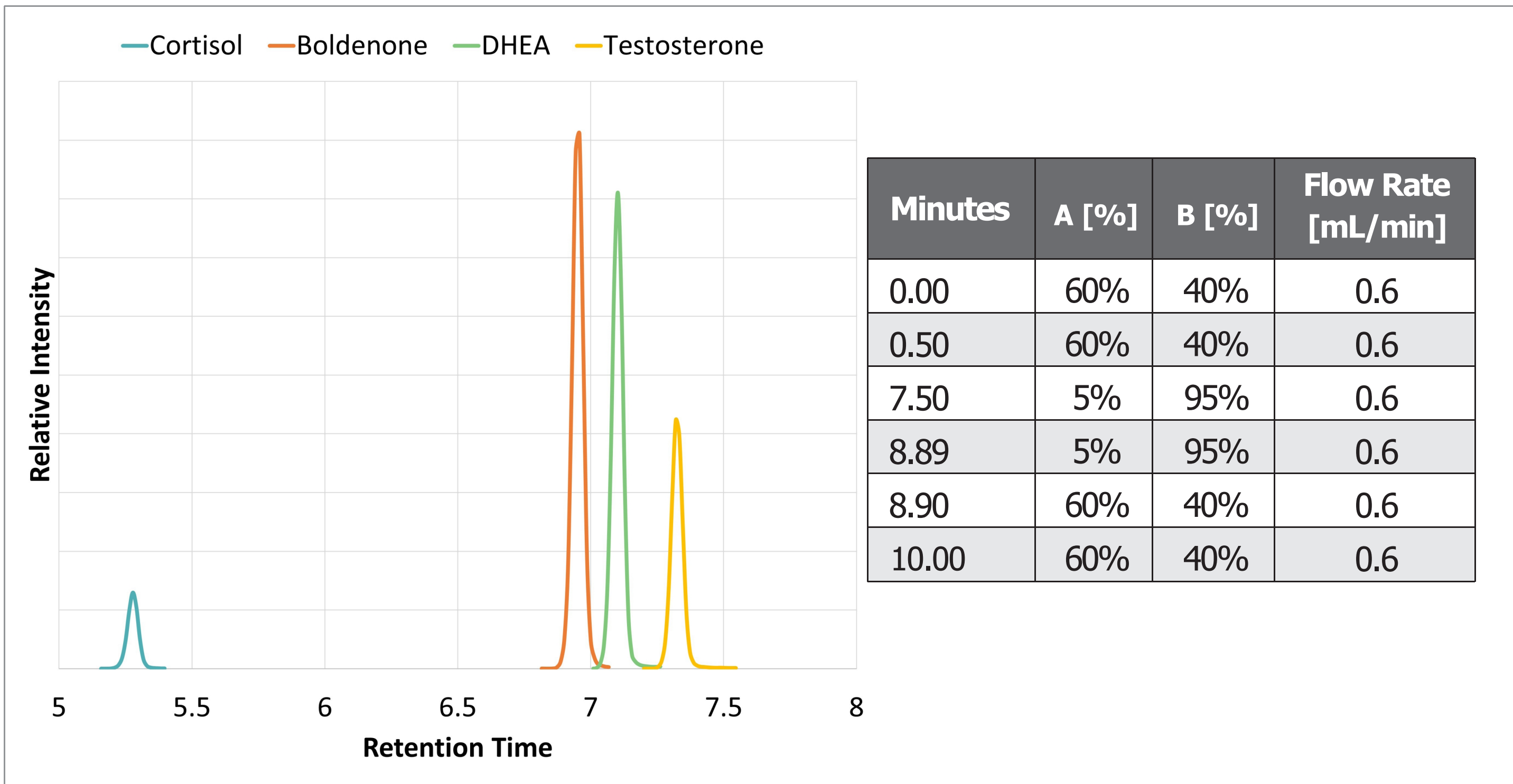


图 2. 提取离子流图叠加，显示 4 种类固醇的分离效果及相应的梯度洗脱程序。

取 200 μL 加标尿液，与 190 μL 100 mM Tris（pH 8.0）、20 μL 内标及 20 μL 酶混合。样品于 37°C 条件下孵育特定时间（15 分钟至 4 小时不等）。水解后的样品用 50% 甲醇稀释并过滤。取 20 μL 样品注入 Thermo Scientific™ Vanquish™ 超高效液相色谱系统，该系统与 Thermo Scientific™ Endura™ 三重四极杆质谱仪联用，色谱柱为 Phenomenex Kinetex® 2.6 μm Biphenyl 100 Å，规格 50 × 4.6 mm。离子源电压在正离子模式下为 4250 V，负离子模式下为 4300 V。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 为甲醇。

结果

在 515 nm 波长下，使用显色底物 4-硝基邻苯二酚硫酸酯（pNCS）比较了纯化后的 Sulfazyme™ PaS、变体 1 和变体 2 的酶活。Sulfazyme™ PaS、变体 1 和变体 2 的酶活分别为 3.8、6.1 和 3.4 U/mg（图 3）。

将纯化的芳基硫酸酯酶与硫酸皮质醇（CS）、硫酸勃地酮（BS）、硫酸睾酮（TS）和硫酸脱氢表雄酮（DHEAS）在 37°C 下孵育长达 4 小时（图 4）。当所有条件下样品的水解程度达到最大水解量（约 380 ng/mL 皮质醇、约 7,300 ng/mL DHEA、约 50 ng/mL 勃地酮、约 105 ng/mL 睾酮）的 ≥80%，且在 pH 8.0 Tris 缓冲的无药物尿液中于 37°C 孵育时，即视为水解完全。

对于这些类固醇，Sulfazyme™ PaS 在 37°C 孵育 4 小时后仅实现 39% 的 CS 水解和 5% 的 DHEAS 水解，对 BS 或 TS 无明显活性。变体 1 在 1 小时内实现 BS 和 TS 的 ≥80% 水解，3 小时内实现 CS 的 ≥80% 水解，但 4 小时后仅实现 32% 的 DHEAS 水解。变体 2 在 3 小时内实现 CS、TS、DHEAS 的 ≥80% 水解，但在 4 小时内仅水解了 22% 的 BS。

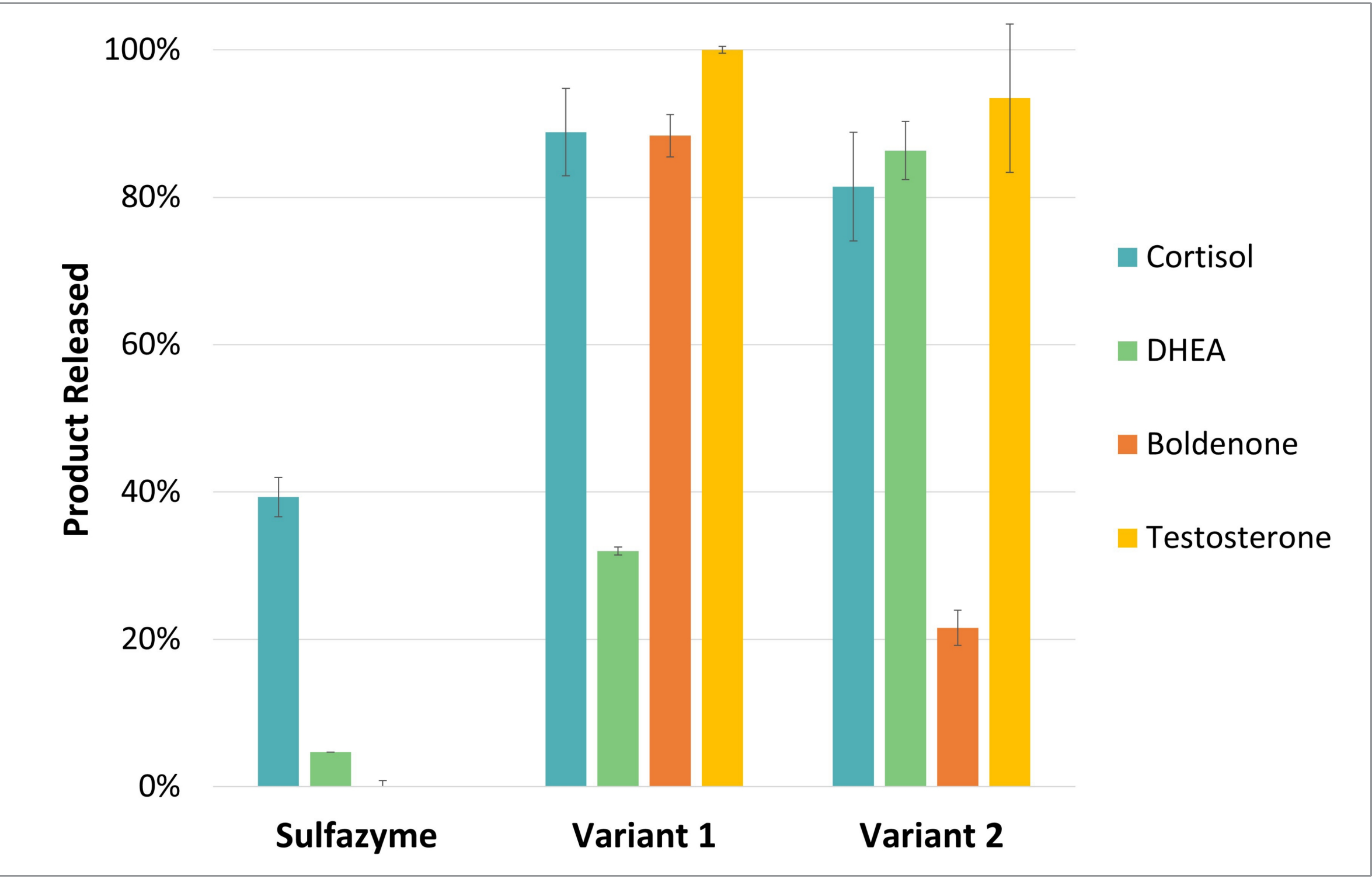


图 4. Sulfazyme™ PaS 在 4 小时后仅实现了 39% 的 CS 水解和 5% 的 DHEAS 水解，且对 BS 或 TS 无明显活性。变体 1 在 1 小时内实现了 BS 和 TS ≥ 80% 的水解。变体 2 在 3 小时内实现了 CS、TS、DHEAS ≥ 80% 的水解。

此前，Uduwela 等人（文献 1）已对铜绿假单胞菌的野生型硫酸酯酶进行了工程化改造，以提高其对类固醇的活性。我们将变体 1（本研究中整体改良效果最佳的变体）对 DHEAS 和 BS 的水解活性与 Uduwela 等人（文献 1）的变体 PaS-PVFV 和 PaS-LEF 进行了比较（图 5）。在此比较中，反应在 pH 8.0 的 Tris 缓冲液、37°C 条件下进行，直至约 30-40% 的底物被水解，以确保反应处于动力学曲线的线性阶段。

结论

- 通过工程化改造铜绿假单胞菌芳基硫酸酯酶，其水解顽固性 β-硫酸化合成代谢雄性激素类固醇（如 DHEAS、CS、BS 及 TS）的能力得到显著提升。
 - 变体 1 在 37°C 条件下，可在 1 小时内完成硫酸勃地酮与硫酸睾酮的水解，并在 3 小时内完成硫酸皮质醇的水解。
 - 变体 2 在 37°C 条件下，可在 3 小时内完成硫酸脱氢表雄酮、硫酸睾酮及硫酸皮质醇的水解。
- 与 Sulfazyme™ PaS 及已报道的硫酸酯酶变体（文献 1）相比，变体1的水解效率得到极大改善。
- 在反兴奋剂实验室的类固醇分析中，硫酸酯酶可替代酸水解方法。

声明

本文作者就职于 Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc.

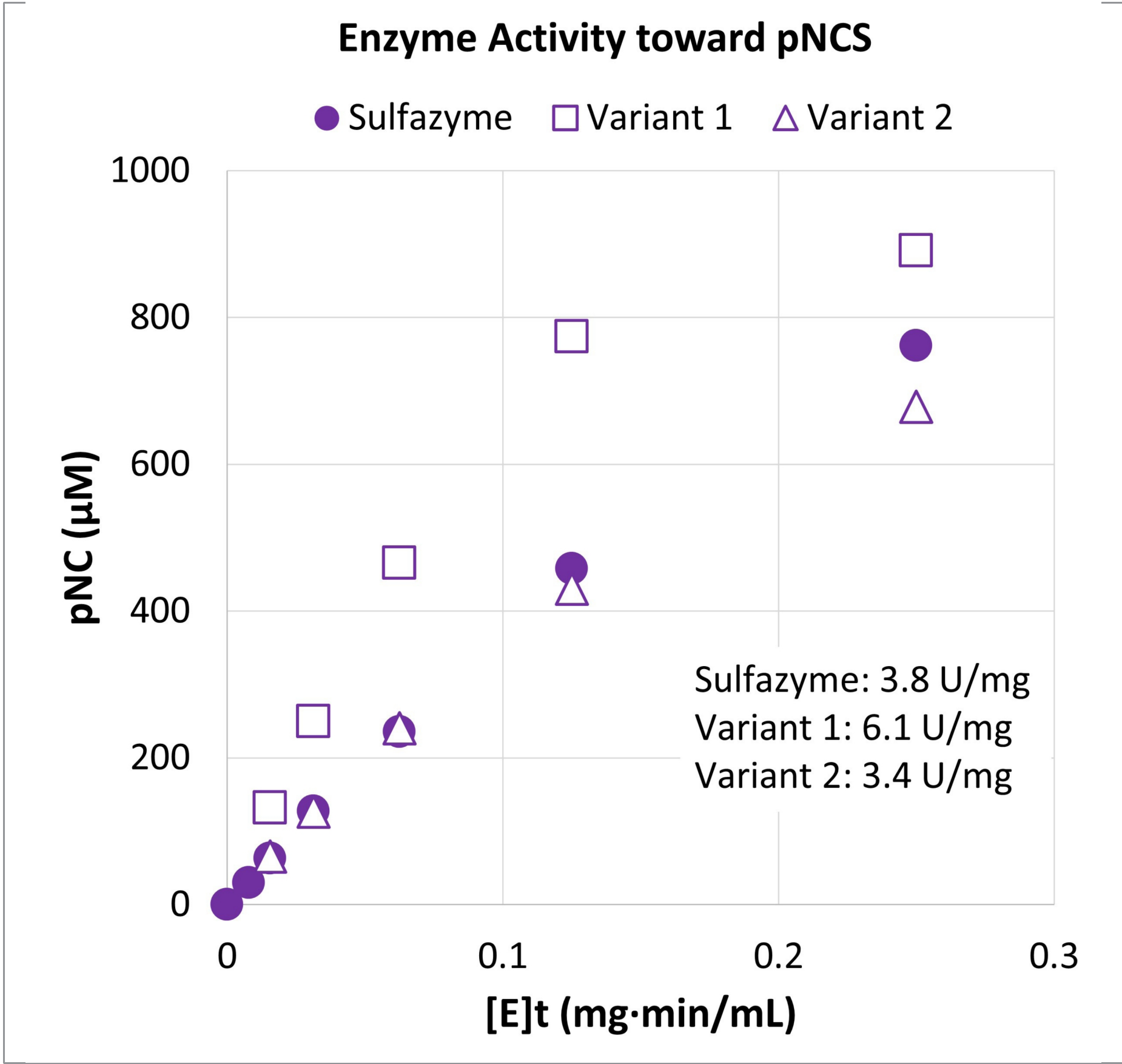


图 3. Sulfazyme™ PaS、变体 1 与变体 2 对 pNCS 的酶活性比较

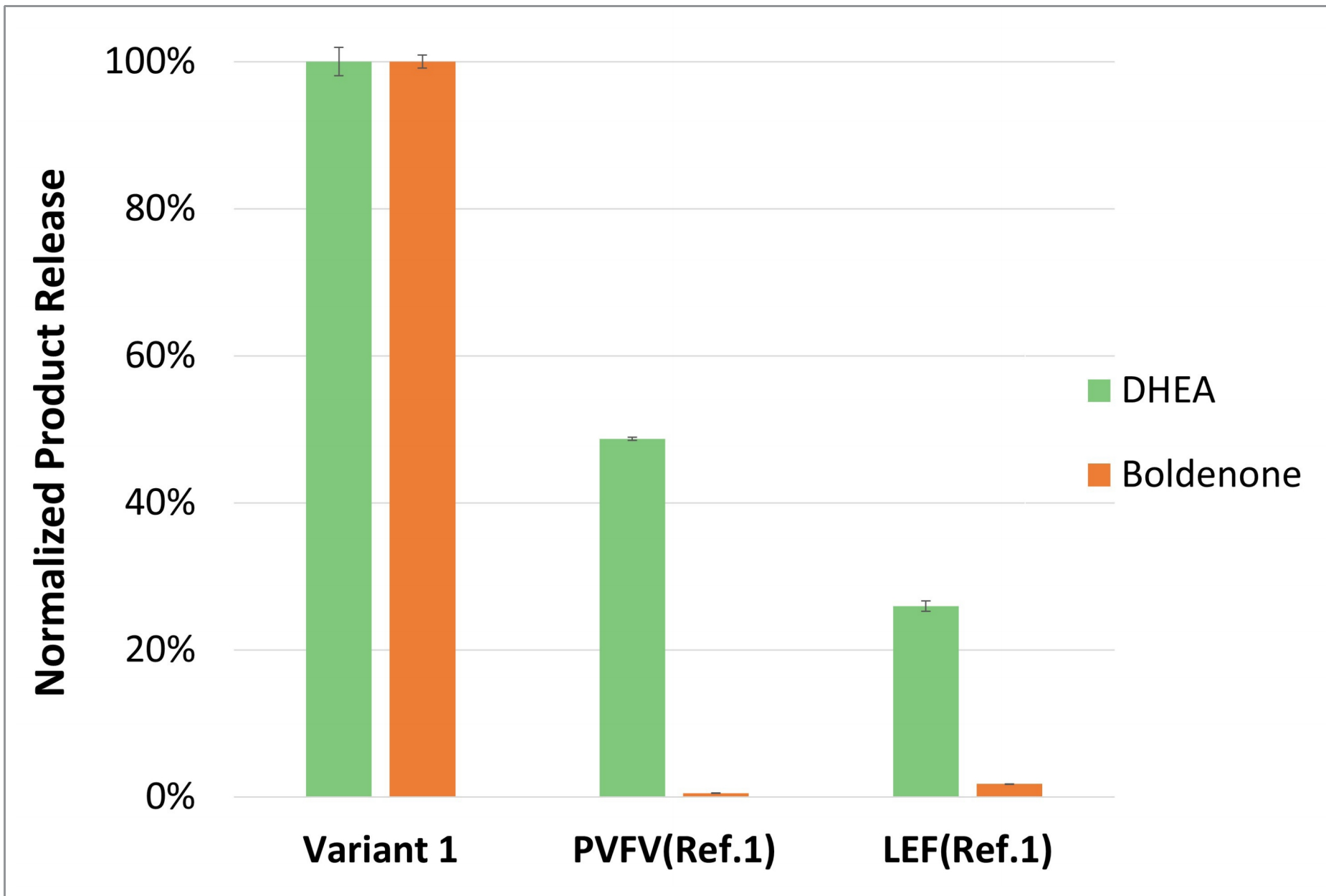


图 5. 变体 1、PaS-PVFV（文献 1）和 PaS-LEF（文献 1）对 DHEAS 和 BS 的相对活性。文献中先前报道的变体 PaS-PVFV 和 PaS-LEF（文献 1），其对 DHEAS 的活性分别约为变体 1 的 50% 和 26%，对硫酸勃地酮的活性约为变体 1 的 1-2%。

参考文献

1. Uduwela DR, PabisA, Stevenson BJ, Kamerlin SCL, and MD McLeod (2018). Enhancing the Steroid Sulfatase Activity of the Arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Catalysis*, **8**, 8902-14.
2. Stevenson BJ, Waller CC, Ma P, Li K, Cawley AT, Ollis DL, and MD McLeod (2015). *Pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase: a purified enzyme for the mild hydrolysis of steroid sulfates. *Drug Test Anal*, **7**, 903-11.

DOWNLOAD POSTER

Scan QR code to get access to this poster online.

