

鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化及其构效关系研究进展

佟晨瑶, 贺真蛟, 耿放, 马美湖, 黄茜, 蔡朝霞*

(国家蛋品加工技术研发分中心, 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 鸡卵黄免疫球蛋白 (egg yolk immunoglobulin, IgY) 是鸡卵黄中的一种免疫球蛋白。由于其具有原料易得、制备简单、不与类风湿因子以及哺乳动物的补体发生交叉反应等优点, IgY是一种颇具潜力的抗生素替代品, 但由于IgY性质不稳定, 易受温度、pH值、酶的影响, 从而限制了其实际应用。糖链在维持IgY理化性质、抗原特性等功能中扮演着重要角色。因此, 对IgY进行糖基化修饰, 从而改善其理化性质和抗原特性, 不仅能使鸡蛋资源得到充分利用, 也为开发蛋黄保健食品、添加剂以及相应的医药产品提供科学依据。本文归纳几种常见的IgY的糖基化方法, 并论述IgY糖基化与其结构、理化性质之间的关系。

关键词: 糖基化; 鸡卵黄免疫球蛋白; 功能活性; 构效关系

Research Progress in the Glycosylation and Structure-Function Relationship of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin

TONG Chen-yao, HE Zhen-jiao, GENG Fang, MA Mei-hu, HUANG Xi, CAI Zhao-xia*

(National R&D Center for Egg Processing, College of Food Science and Technology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Egg yolk immunoglobulin (IgY) is an antibody existing in the egg yolk. It is easy to be obtained and produced. Also, it does not interact with rheumatoid factors or activate mammalian complement. Therefore it has become a potentially promising alternative to antibiotics. However, the application of IgY is limited due to its susceptibility to temperature, pH and enzymatic degradation. The glycan structure of IgY plays an important role in maintaining the structure, physicochemical properties, antigenic properties and other functions of IgY. Glycosylation in IgY can improve its physical and chemical properties, which not only makes egg resources to be fully utilized but also provides a scientific basis for the development of egg yolk as health food, additives and other pharmaceutically relevant products. This article reviews several approaches for IgY glycosylation and discusses the relationships between glycosylation and the structures and physicochemical properties of IgY.

Key words: glycosylation; chicken egg yolk immunoglobulins; functional activity; structure-function relationship

中图分类号: Q51

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 05-0230-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405045

蛋白质糖基化是真核生物最重要的修饰之一, 具体是指合成后的或正在合成的蛋白质在糖基转移酶的作用下将活化的糖加到肽链上的过程^[1]。蛋白质的糖基化不仅在维持空间构象、稳定糖蛋白结构、保护其免受某些蛋白酶裂解、增强蛋白质分子的溶解性以及增加蛋白质的生物半衰期等方面有重要作用, 而且还能改变某些蛋白质的生物活性和抗原特性。因此对蛋白质进行糖基化修饰, 具有十分重要的意义。

鸡卵黄免疫球蛋白 (egg yolk immunoglobulin,

IgY) 是一种在鸡蛋黄里发现的免疫球蛋白, 其结构类似于哺乳动物的免疫球蛋白IgG, 但相较于IgG, IgY具有无需采血, 不与类风湿因子、哺乳动物的补体发生交叉反应等优点, 另外, 特异性IgY在中和蛇毒, 抗轮状病毒等方面也有广泛的应用^[2-5]。一般情况下, 当其他哺乳动物在对抗高度保守表位蛋白质无法产生免疫应答时, 由于鸟类和哺乳动物物种间的隔离, IgY有可能可以产生应答^[6]。对IgY进行糖基化修饰, 可以改善其对热、酸度、酶解的稳定性和免疫活性, 从而拓展其应用领域, 并为IgY代替哺

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371810); 中央高校基本科研业务费专项资金优秀人才培养项目 (2013PY036)

作者简介: 佟晨瑶 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: tongchenyaoyy@163.com

*通信作者: 蔡朝霞 (1979—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: caizhaoxia@mail.hzau.edu.cn

乳动物的IgG提供一定的理论基础。因此, IgY的糖基化修饰具有重要的研究意义和应用价值。

1 蛋白质的糖基化方法

蛋白质糖基化修饰的常用方法有3种, 分别是随机的会聚式糖基化反应、化学选择性及位置专一性的糖基化反应、定点突变型的糖基化反应^[7-8]。

1.1 随机的会聚式糖基化反应

随机的会聚式糖基化反应是通过化学反应, 对蛋白质糖链上的某类官能团进行糖基化修饰, 产生一组糖基化位点不确定的混合物。主要包括2-亚氨基甲氧基甲基硫苷法^[9]、还原型胺化法^[10]和美拉德反应^[11]。前两种方法都是通过将糖基连接到赖氨酸残基上来实现的。2-亚氨基甲氧基甲基硫苷法, 即把2-亚氨基甲氧基甲基硫苷连接到蛋白表面赖氨酸上^[9]。还原型胺化法是在还原剂作用下, 糖还原端醛基和蛋白中的氨基缩合形成希夫碱, 生成稳定的拟糖蛋白的过程^[10]。美拉德反应是随机会聚式糖基化反应中的主要类型, 在此反应中, 蛋白质中的氨基与糖分子中的羧基发生共价结合, 不需要添加任何化学试剂作为催化剂, 仅加热就可使反应自发进行。由于美拉德反应机理十分复杂, 其反应历程、产物的性质及组成受到多种因素的影响, 糖基化位点不易确定, 但正因如此, 该方法糖基化类型丰富, 对蛋白质的凝胶性、乳化性、过敏原性等多方面功能性质均可产生影响, 故应用广泛^[11]。影响美拉德反应的因素非常多, 除了反应物种类、反应pH值和温度以外, 研究发现在真空中进行糖基化比常压下进行糖基化效果要好, 这主要是由于在真空中避免了不完整糖化作用、美拉德反应末端终产物的生成、由于溶剂诱导使蛋白质变性以及酶失活等问题^[12]。

1.2 化学选择性及位置专一性的糖基化反应

化学选择性及位置专一性的糖基化反应是通过化学或酶法进行糖基化修饰^[7]。其中化学法是通过化学方法标记肽链中需要反应的位置或针对肽链的某个特异性基团进行糖基化^[13]。该方法条件比较温和, 可以在不影响其他官能团的情况下确定反应位置^[14], 并且能够在蛋白骨架中导入非天然的氨基酸, 在拟糖肽/拟糖蛋白药物改造研究领域有不可比拟的优势, 但是由于其是通过化学方法合成, 所以肽链的长度受到限制^[8]。酶法是糖基化工程中另一种重要的方法, 具有高效、专一、条件温和等优点, 催化反应速度快, 与化学法相比, 所需酶量极其微小。但酶的价格昂贵, 且很多酶法糖基化需要特定的识别序列, 所以对很多蛋白质不太可能适用^[15]。

1.3 定点突变型的糖基化反应

定点突变型的糖基化反应是指通过定点突变技术改

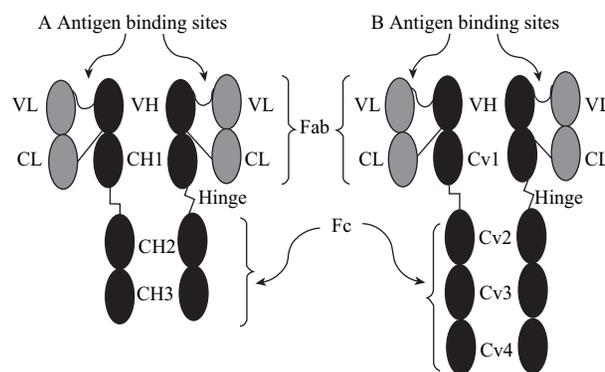
变蛋白质的氨基酸序列, 引入糖基化位点, 从而改变蛋白质的糖链^[8]。Davis等^[16]将分离纯化后的糖链化合物通过一锅法合成用于生物体硒代谢中硫硒键连接的拟糖蛋白。通过突变技术控制反应位点, 合成的糖蛋白和糖肽的长度不受限制, 可以直接作用于天然蛋白质^[17]。但由于很多蛋白质氨基酸结构和糖基化位点尚未清楚, 蛋白质的构效关系也未得到阐明, 所以定点突变型糖基化存在一定的盲目性。

2 鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化及其构效关系

2.1 鸡卵黄免疫球蛋白和哺乳动物IgG结构比较

哺乳动物体内有5种免疫球蛋白, 分别为IgG、IgA、IgM、IgD和IgE, 其中IgG是含量最高, 也是研究最多的一种免疫球蛋白。IgY是唯一存在于鸡卵黄中的免疫球蛋白, 其结构与IgG类似。

图1A为IgG结构, 图1B为IgY结构^[18]。IgG和IgY都是由4条链组成的, 分别是两条重链(H)和两条轻链(L)。IgG分子质量约为150 kD, 其中重链约为55~77 kD, 轻链约为25 kD。IgY分子质量约为180 kD, 其中重链约为67~70 kD, 轻链约为22~30 kD^[19]。IgG的重链由一个可变区(V)和3个恒定区(C)组成, 而IgY的重链由一个可变区和4个恒定区组成。另外, IgY和IgG可分为两个抗原结合片段(Fab)和一个可结晶片段(Fc)。



A.哺乳动物的IgG结构示意图; B.IgY的结构示意图。VH.重链可变区; VL.轻链可变区; CH1、CH2、CH3. IgG重链的3个恒定区; Cv1、Cv2、Cv3、Cv4. IgY重链的4个恒定区。

图1 免疫球蛋白结构分析

Fig.1 Structural analysis of immunoglobulins

2.2 鸡卵黄免疫球蛋白的糖链结构分析

免疫球蛋白作为一种糖蛋白, 其绝大部分的糖链存在于重链的稳定区^[20]。糖链一般由甘露糖、半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰氨基半乳糖、唾液酸等构成, 此外还存在少量的岩藻糖。免疫球蛋白中的糖链数目、种类以及连接的位置都随免疫球蛋白的种类而异。

糖链一般连接在Ig的 Fab、Fc及绞链区。在IgG、IgA、IgD中, 连结Fab与Fc的绞链区由二硫键形成; 而IgE、IgM的绞链区含有N-聚糖和O-聚糖, 这使得IgE和IgM的结构缺乏柔韧性^[21]。IgG只含2~3条N-乙酰氨基葡萄糖的聚糖, 其含糖量最少; IgA和IgE含4~5条N-乙酰氨基半乳糖的聚糖; IgM每一条重链上含5个糖基化位点, 主要存在于Fab区^[20]。虽然IgG、IgM、IgE、IgA结构相似, 但是它们的糖基化位点各不相同。IgG其Fc区的Asn297含有唯一的N-糖基化修饰保守位点, 其糖链由于核心七糖上连接的末端糖基不同而具有特异性^[22]。位点突变实验还推断出在IgG重链的CH2/CH3表位, 尤其是残基362~365和550~553位点在IgG与受体交联的反应中起着不可忽视的作用^[23]。IgM在CH3的Asn394有N-糖基化修饰位点, 此位点是IgM唯一的高甘露糖型^[19]。

Suzuki等^[24]通过高效液相色谱-质谱分析显示IgY有单甘露糖化血红蛋白、甘露糖寡糖、双天线寡糖结构, 前两种结构是IgY不同于其他蛋白的主要糖型结构。其中甘露糖型占37.2%, 而Glc₁Man_{8,9}GlcNAc₂占整个甘露糖型的71.2%, 且IgY在Cv2和Cv3区的Asn308和Asn407有两个潜在的N-糖基化修饰位点。

2.3 鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化与结构、功能的关系

免疫球蛋白的糖基化在维持空间构象、稳定糖蛋白结构方面起着重要作用。首先是具有一定氨基酸排列顺序的多肽链需要进一步折叠, 形成一定空间结构的蛋白质分子, 才能发挥生物学功能。另外, 在蛋白质折叠的过程中, 糖蛋白的糖基化位点起到关键作用。同时, Bechor等^[25]在不影响蛋白质结构的条件下选择6个糖基化位点进行糖基化, 发现糖链的引入能够增加蛋白的结构稳定性, 并且这种稳定性与糖基的数量成正比, 受糖链大小影响较小。

另外, 有学者比较了不同来源的免疫球蛋白(人、山羊、兔、鼠、水牛、鸡卵黄)对果糖基化的敏感程度^[26]。结果表明虽然不同来源的免疫球蛋白的结构都十分相似, 但它们对果糖基化的敏感性程度却各不相同。其中卵黄来源的IgY对果糖基化最为敏感, 而山羊IgG最不敏感, 说明糖基化程度可能是与免疫球蛋白暴露的氨基酸基团有关。同时果糖基化后免疫球蛋白的活性发生了变化, 推测原因是糖基化的位点会影响免疫球蛋白与抗原的结合能力。

蛋白质表面的糖链还可覆盖蛋白质分子中的某些蛋白酶降解位点, 从而增加了蛋白质对于蛋白酶的抗性^[27]。在膜型Ig(mIg)中, mIg在参与体液免疫的B细胞膜上有着严格的立体构象, 糖基化的程度不当会导致这种构象的改变, 就会直接降低其识别和结合抗原的能力^[28]。当糖基化程度较低时, 会使mIg肽链缺乏刚性。而糖基化过度, 就会遮住mIg的抗原结合位点, 影响其与抗原的结合^[29]。

2.4 鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化与理化性质的关系

目前已有大量研究表明糖基化可提高蛋白质的结构稳定性, 防止蛋白质的相互聚集, 主要是改善蛋白质的热稳定性、对酶以及pH值的敏感性^[30]。Pham等^[31]于真空条件下将葡萄糖和酶进行孵育, 将葡萄糖共价连接到了蛋白质的赖氨酸残基上, 发现糖基化的胰蛋白酶仍然具有活性, 糖基化的糜蛋白酶也保持在45%的活性, 而未糖基化的胰蛋白酶和糜蛋白酶都已完全失活, 表明了糖基化可使蛋白质的热稳定性显著增强。Anbarasan等^[32]发现经糖基化修饰的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)具有8个N-连接的葡聚糖残基, 但是其热稳定性、活性不变。另有文献表明蛋白质的稳定性不仅和糖基化的状态及种类有关, 还和pH值有密切关系。Wang Wei等^[33]发现在pH 4.0处糖基化, 白介素2(interleukin 2, IL-2)突变蛋白其热稳定性会下降, 而在pH 5.5处糖基化其热稳定性上升。这些研究成果证明糖基化对蛋白质的稳定性有重要的影响。

随着有关免疫球蛋白报道的增多, IgY以其独特的免疫功能引起了越来越多的国内外研究学者的广泛重视。但是, 作为一种非常有前景的抗生素替代物, IgY性质不稳定, 易受温度、酸碱、酶的影响, 从而限制了IgY的实际应用领域。IgY与哺乳动物体内的IgG相比, 其酸碱稳定性远不如IgG, 原因是IgY分子结构中的二硫键较少^[34], 且缺乏灵活的绞链区域, 这个不灵活的结构也在哺乳动物的IgE里被发现。因此, IgY表现出哺乳动物体内IgE和IgG共有的结构特征, IgY的Fc区域的结构分析也支持这一说法^[35]。

3 结语

我国鸡蛋资源丰富, 因此充分利用鸡卵黄资源提取出免疫活性成分并使其稳定性得到保护具有重大的经济及现实意义, 不仅使鸡蛋资源得到了充分利用, 拓宽鸡蛋的利用渠道, 提高鸡蛋的附加值, 开拓市场, 给鸡殖业带来巨大的经济效益, 同时也为保健品市场提供功能性食品基料, 为禽蛋功能性食品的开发打下坚实的基础。目前对卵黄来源IgY的研究主要集中在制备、分离纯化及其应用上; 而研究修饰结构, 结构与稳定性以及免疫活性关系尚少。由于IgY和IgG的相似性, 随着对IgG研究的深入, 人们越来越清楚地意识到免疫球蛋白糖链在维持其自身的结构、理化性质、抗原特性等功能中扮演重要角色。在实际应用方面, 鸡卵黄免疫球蛋白的糖基化研究, 在科学研究的基础上为开发蛋黄深加工保健食品、添加剂以及医药产品提供了一定的科学依据, 从而使我国蛋品资源的原料优势转化为产品优势, 资源优势转化为经济优势。

参考文献:

- [1] 严钦, 俞慧清, 成国祥. 蛋白糖基化与免疫研究进展[J]. 现代免疫学, 2008, 28(2): 165-168.
- [2] XU Fanxing, XU Yongping, JIN Liji, et al. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease-causing *Fusobacterium nucleatum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 983-991.
- [3] LI Xiaoyu, HE Liu, XU Yongping, et al. Chicken egg yolk antibody (IgY) controls solobacterium moorei under *in vitro* and *in vivo* conditions[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012(6): 1448-1458.
- [4] WANG Linhui, LI Xiaoyu, JIN Liji, et al. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitiscaying *Staphylococcus aureus*[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 149(3/4): 415-421.
- [5] ZHEN Yuhong, JIN Liji, LI Xiaoyu, et al. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 133(4): 317-322.
- [6] EDZARD S, INGKE B, KERSTIN G. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy[J]. Biologicals, 2012, 40(5): 313-322.
- [7] GAMBLIN D P, SCANLAN E M, DAVIS B G. Glycoprotein synthesis: an update[J]. Chemical Reviews, 2009, 109(1): 131-163.
- [8] 连高焱, 俞飏. 蛋白质的化学糖基化研究进展[J]. 中国科学: 化学, 2012, 42(12): 1746-1759.
- [9] LEE Y C, STOWELL C P, KRANTZ M J. 2-Imino-2-methoxyethyl-1-thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins[J]. Biochemistry, 1976, 15(18): 3956-3963.
- [10] GRAY G R. The direct coupling of oligosaccharides to proteins and derivatized gels[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1974, 163(1): 426-428.
- [11] MA Xiaojuan, CHEN Hongbing, GAO Jinyan, et al. Conformation affects the potential allergenicity of ovalbumin after heating and glycation[J]. Food Additives and Containants, 2013, 30(10): 1684-1692.
- [12] WERNER R G, KOPP K, SCHLUETER M. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems[J]. Acta Paediatrica, 2007, 96: 17-22.
- [13] HANG H C, BERTOZZI C R. Chemosselective approaches to glycoprotein assembly[J]. Accounts of Chemical Research, 2001, 34(9): 727-736.
- [14] van BERKEL S S, van ELDIJK M B, van HEST J. Staudinger ligation as a method for bioconjugation[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2011, 50(38): 8806-8827.
- [15] HALTIWANGER R S, LOWE J B. Role of glycosylation in development [J]. Annual Review of Biochemistry, 2004, 73(1): 491-537.
- [16] BOUTUREIRA O, BERNARDES G J L, FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ M, et al. Selenenylsulfide-linked homogeneous glycopeptides and glycoproteins: synthesis of human "hepatic Se metabolite A"[J]. Angewandte Chemie, 2012, 124(6): 1461-1465.
- [17] van KASTEREN S I, KRAMER H B, GAMBLIN D P, et al. Site-selective glycosylation of proteins: creating synthetic glycoproteins[J]. Nature Protocols, 2007, 2(12): 3185-3194.
- [18] WILMAR D S, DENISE V T. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2010, 135(3/4): 173-180.
- [19] ARNOLD J N, WORMALD M R, SIM R B, et al. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins[J]. Annual Review of Immunology, 2007, 25(1): 21-50.
- [20] RAMSLAND P A, FARRUGIA W. Crystal structures of human antibodies detailed and unfinished tapestry of immunoglobulins gene products[J]. Journal of Molecular Recognition, 2002, 15(5): 248-259.
- [21] MENINI T, GUGLIUCCI A, STAHL A J C. Polyclonal immunoglobulin M: location of glycation sites[J]. Clinica Chimica Acta, 1992, 213(1/3): 23-35.
- [22] HUH C, SELMAN M H J, RUHAAK L R, et al. IgG glycosylation analysis[J]. Proteomics, 2009, 9(4): 882-913.
- [23] MORRISON S L, MOHAMMED M S, WIMS L A, et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk[J]. Molecular Immunology, 2002, 38(8): 619-625.
- [24] SUZUKI N, LEE Y C. Site-specific *N*-glycosylation of chicken serum IgG[J]. Glycobiology, 2004, 14(3): 275-292.
- [25] BECHOR D S, LEVY Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(24): 8256-8261.
- [26] DEEBA S J, SHAMILA F, SALEEMUDDIN M. Immunoglobulin glycation with fructose: a comparative study[J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 378(1): 86-92.
- [27] 朱立平. 蛋白质糖基化与B细胞免疫[J]. 现代免疫学, 2001, 21(4): 193-194.
- [28] SALA R J, GRIBINOW K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98(4): 1223-1245.
- [29] SPERANDIO M, GLEISSNER C A, LEY K. Glycosylation in immune cell trafficking[J]. Immunological Reviews, 2009, 230(1): 290-293.
- [30] SPIRO R G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and disease implications of glycopeptide bonds[J]. Glycobiology, 2002, 12(4): 43-56.
- [31] PHAM V T, EWING E, KAPLAN H, et al. Glycation improves the thermostability of trypsin and chymotrypsin[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 101(3): 452-459.
- [32] ANBARASAN S, JENIS J, PALOHEIMO M, et al. Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(1): 356-360.
- [33] WANG Wei, ANTONSEN K, WANG Y J, et al. pH dependent effect of glycosylation on protein stability[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 33(2): 120-127.
- [34] SHIMIZU M, NAGASHIMA H, SANO K, et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1992, 56(2): 270-284.
- [35] TAYLOR A I, FABIANE S M, SUTTON B J, et al. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE[J]. Biochemistry, 2009, 48(3): 558-562.