

## 鸡卵黄免疫球蛋白的 mPEG 修饰及其稳定性研究

王丽英, 马美湖\*, 黄群, 史晓霞

华中农业大学, 国家蛋品加工技术研发分中心, 湖北 武汉 430070

**摘要** 研究了单甲氧基聚乙二醇(mPEG)对鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的化学修饰, 并通过傅里叶变换红外光谱、圆二色光谱和荧光光谱分析比较了修饰前后 IgY 的稳定性。首先用 N-羧基琥珀酰亚胺活化的单甲氧基聚乙二醇(NHS-mPEG)对 IgY 进行化学修饰, 确定了 mPEG 的最佳修饰条件, 即 IgY 与 mPEG 摩尔比为 1:10、pH 值为 7、反应时间为 1 h, 所得产物 mPEG-IgY 修饰率为 20.56%, 活性保持率为 87.62%。其次通过光谱分析法对 IgY 以及 mPEG-IgY 的热稳定性和酸碱稳定性进行了研究。结果表明, 70 °C 温育 120 min 后, IgY 的  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -Turn, Random 各二级结构含量由 14.5%, 42.1%, 6.2%, 37.2% 变为 1.6%, 55.25%, 5.8%, 37.5%; mPEG-IgY 的各二级结构含量由 12.9%, 42.7%, 6.3%, 38.1% 变为 3.1%, 50.5%, 7.2%, 39.2%。同样酸碱处理后, mPEG-IgY 比修饰前 IgY 所引起的二级结构变化更小。因此可以推断出 IgY 经过 mPEG 修饰后对温度、酸碱处理所引起的变性有着更强的稳定性。

**关键词** 单甲氧基聚乙二醇; 卵黄免疫球蛋白; 化学修饰; 光谱分析; 稳定性

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2012)09-2501-07

### 引言

鸡卵黄免疫球蛋白, 简称 IgY (chicken egg yolk immunoglobulin), 又称鸡卵黄抗体, 是产蛋母鸡受免疫刺激后, 母鸡产生免疫反应, 在输卵管内卵黄成熟期, 血液中 IgG 被选择性地转移到卵黄中唯一的免疫球蛋白类<sup>[1]</sup>。经大量的研究发现, IgY 具有不与人类补体以及类风湿因子结合<sup>[2]</sup>等免疫学特性, 现在已被广泛应用于免疫学诊断和医药等许多方面。由于 IgY 是蛋白质类大分子, 具有一定的免疫原性, 当其用于机体时, 会引发抗体产生而降低疗效, 并且易受温度、酸碱的影响, 在所有种类免疫球蛋白中稳定性最低<sup>[3, 4]</sup>, 从而限制了 IgY 的应用领域。聚乙二醇修饰(PEG modification)是 20 世纪 70 年代后期逐渐发展起来的一项热门技术, 经过几十年的发展, PEG 化技术不仅在蛋白质类药物的开发中得到普遍的应用, 而且已扩展到新型药物载体、控释制剂等各个领域<sup>[5, 6]</sup>。研究表明, 经 PEG 修饰后, 大多数蛋白质发生免疫原性与抗原性降低, 热稳定性及机械稳定性增加, 溶解性增加, 循环半衰期延长, 耐蛋白酶水解等性质的改变<sup>[7]</sup>。本工作主要研究了单甲氧基聚乙二醇(mPEG)修饰过程中各因素对修饰效果的影响, 并应用光谱分析法对 IgY 以

及修饰物 mPEG-IgY 温度、酸碱稳定性进行了比较。对充分利用鸡卵黄提取免疫活性成分并使得稳定性得到保护具有重大经济及现实意义。

### 1 实验部分

#### 1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋(武汉九峰山养鸡场); 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY, 实验室制备, 纯度 95.02%); 鸡 IgY ELISA 试剂盒、2,4,6-三硝基苯磺酸、单甲氧基聚乙二醇(mPEG, Mr: 5 000 KD)、N,N'-二甲基甲酰胺、丁二酸酐、N-羧基琥珀酰亚胺、二环己基碳二亚胺等购自 Sigma 公司。

#### 1.2 仪器与设备

ALPHA 1-4 LD plus 冷冻干燥机(德国 Christ 公司); DYY-12 电泳仪(北京六一仪器厂); DU700 紫外-可见分光光度计(美国贝克曼库尔特有限公司); FE20 pH 计(梅特勒-托利多中国有限公司); 酶标仪(IMARK); VERTEX 70 型傅里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司); J-80 圆二色光谱仪(日本 JASCO 公司); RF-5301pc 荧光分光光度计(日本日立公司)。

#### 1.3 IgY 制备与活性测定

收稿日期: 2012-03-11, 修订日期: 2012-05-30

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-41-K23)资助

作者简介: 王丽英, 女, 1988 年生, 华中农业大学食品科学技术学院硕士研究生 e-mail: wangliyong20052709@163.com

\* 通讯联系人 e-mail: mameihuhn@yahoo.com.cn

Akita 和 Nakai<sup>[8]</sup>提出的水稀释法为基础,并加以改良,结合聚乙烯醇沉淀以及 DEAE-Toyopearl 650M 一步洗脱离子交换层析法进行分离纯化 IgY,制得的 IgY 纯度为 95.02%,活性保持率为 73.77%<sup>[9]</sup>。

采用 ELISA 方法检测 IgY 活性<sup>[10]</sup>。以标准物的浓度为横坐标,OD450 nm 值为纵坐标,绘出标准曲线,根据样品的吸光值和稀释倍数计算出活性含量。

$\text{IgY 活性保持率}(\%) = \text{处理后样品活性含量} / \text{处理前样品活性含量}$

#### 1.4 mPEG 活化

mPEG 的活化采用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化法<sup>[11]</sup>,活化后得 mPEG 的 N-羟基琥珀酰亚胺衍生物,简称为 NHS-mPEG。

活化度为活化后每单位 mPEG 中所含 NHS-mPEG 的百分数,采用 NHS 标准曲线法测定,以 NHS 终浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作标准曲线<sup>[12]</sup>。样品测定时 NHS-mPEG 浓度为  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,具体步骤与标准曲线测定基本一致。

#### 1.5 IgY 的 NHS-mPEG 修饰

鸡卵黄免疫球蛋白与活化的 mPEG 按照一定摩尔比混合,采用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  四硼酸钠作为缓冲液,温度为  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,一定时间后,甘氨酸终止反应,以蒸馏水和未修饰的 IgY 溶液进行相同的反应作为对照<sup>[13]</sup>。取样测定蛋白氨基修饰率,作 SDS-PAGE 凝胶电泳<sup>[14]</sup>,并测定生物活性。对修饰条件进行优化,分别设定 IgY 与 mPEG 摩尔比为 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 和 1:40;缓冲液 pH 值分别为 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0;反应时间设定为 15, 30, 45, 60, 90, 120 和 240 min。

修饰率测定采用 TNBS 标准曲线法测定氨基修饰率:以甘氨酸为标准溶液,  $600 \mu\text{L}$  硼酸缓冲液加 2.5% 的 TNBS 溶液作为空白对照,制得标准曲线<sup>[15]</sup>。样品测定时加入 2.5% 的 TNBS 溶液,室温下反应 120 min 后测定 420 nm 下的吸收值,由坐标图得待测样品溶液的修饰率。

#### 1.6 NHS-mPEG 稳定性

##### 1.6.1 热稳定性

配制鸡卵黄免疫球蛋白溶液  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,于  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  的水浴中保温,30, 60, 90, 120 min 取样后冰水浴中迅速冷却,进行圆二色光谱扫描。

##### 1.6.2 酸碱稳定性

调整 PBS 溶液的 pH 值分别为 3.0, 4.0, 10.0, 11.0, 各取一定体积的溶液与  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  免疫球蛋白溶液混匀,放置在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中并振荡。每隔一定时间将样品取出后调整 pH 为 7.0,取样进行圆二色光谱和荧光光谱扫描。

#### 1.7 光谱测定

红外光谱:取待测粉末状样品与溴化钾(质量比约 1:10)压片,检测红外光谱。检测条件:硅碳棒光源, MTC 探测器,室温测量范围为  $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ ,光谱分辨率为  $4 \text{ cm}^{-1}$ ,信号扫描累加 32 次,每个样品至少检测三次。

圆二色光谱:配制鸡卵黄免疫球蛋白浓度  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。石英样品池的光程  $0.1 \text{ cm}$ ,灵敏度为  $2 \text{ mdeg} \cdot \text{m}^{-1}$ ,

扫描测定波长范围为  $190 \sim 240 \text{ nm}$ ,扫描速度为  $3.3 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,分辨率为  $0.1 \text{ nm}$ ,在室温下进行测定。所有圆二色数据经 3 次扫描取平均值。得出圆二色谱后,经软件计算出二级结构含量。

荧光光谱:样品浓度  $2.0 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,采用光径为  $1.0 \text{ cm}$  的石英样品池,激发波长  $296 \text{ nm}$ ,狭缝宽度为  $5 \text{ nm}$ ,扫描范围  $300 \sim 500 \text{ nm}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 mPEG 活化以及活化前后红外光谱图

由标准曲线  $y = 9.165x + 0.0051$  ( $R^2 = 0.9998$ ) 计算活化度为 81.09%。

图 1(a) 和 (b) 分别为 mPEG 以及活化后产物 NHS-mPEG 红外光谱扫描图。对比 (a) 和 (b) 可知, mPEG 经过 NHS 修饰后出现  $1968.92 \text{ cm}^{-1}$  (C=O 琥珀酰胺)、 $1637.63 \text{ cm}^{-1}$  (C=O 伸缩振动) 以及  $3460.64 \text{ cm}^{-1}$  (N-H 的最大吸收峰),说明 mPEG 活化成功。

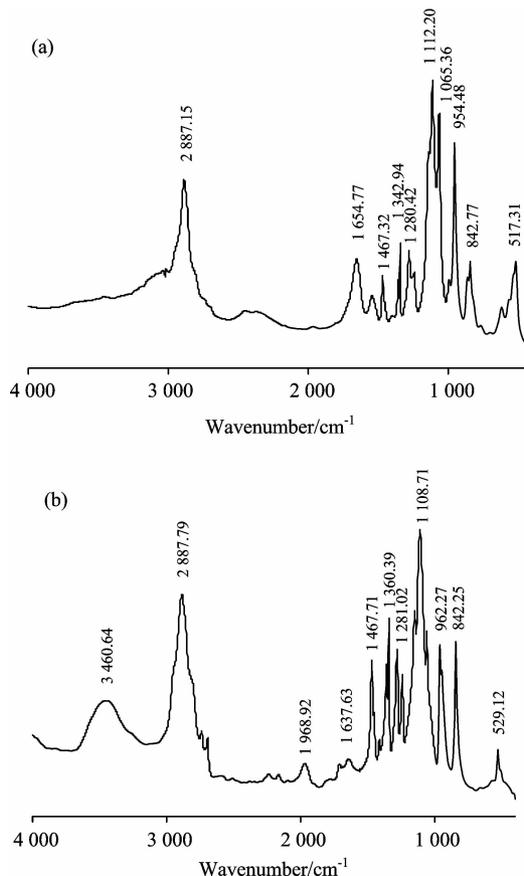


Fig. 1 FTIR spectra of mPEG and NHS-mPEG

(a): mPEG; (b): NHS-mPEG

### 2.2 修饰工艺优化

#### 2.2.1 不同摩尔比对 IgY 修饰效果的影响

图 2(a) 为不同摩尔比条件下 IgY 修饰效果的 SDS-PAGE 电泳图,图 2(b) 为不同摩尔比条件下 IgY 的修饰率以及活性保持率测定结果图。由图 2(a) 可以看出,随着 IgY 与

活化后的 mPEG 按摩尔比的增大, 70 KD 左右的条带逐渐变浅, 并伴随有较大分子量产物的出现, 这也就说明 IgY 的修饰度在逐渐增加。由图 2(b)可以看出, 随着反应摩尔比的增加, IgY 的修饰率逐渐增大, 而活性保持率呈下降趋势。由研究结果可以初步判定氨基修饰程度与 IgY 活性之间存在相关性, 为了保持 80% 以上的 IgY 选择修饰摩尔比为 1 : 10, 此时可得修饰率为 20.51%, 活性保持率为 87.56% 的 mPEG-IgY。

### 2.2.2 不同反应时间对 IgY 修饰效果的影响

图 3(a) 为不同修饰时间条件下 IgY 修饰效果的 SDS-

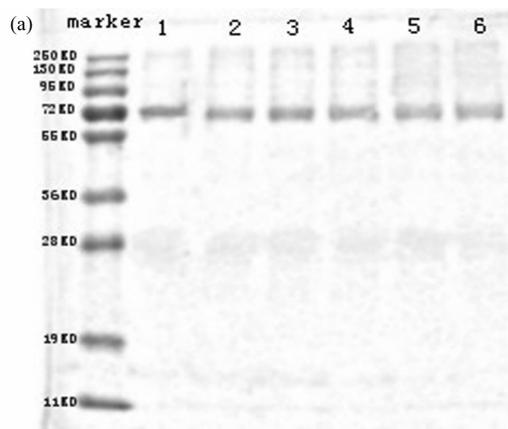


Fig. 2 Effects of different molar rate on the efficiency of IgY modification

(a): Results of SDS-PAGE, 1-6 bonds corresponding to molar rate (IgY : mPEG) 3 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 15 : 1, 20 : 1, 40 : 1 ;  
(b): Effects of different molar rate on the modification rate and activity reservation of IgY modification

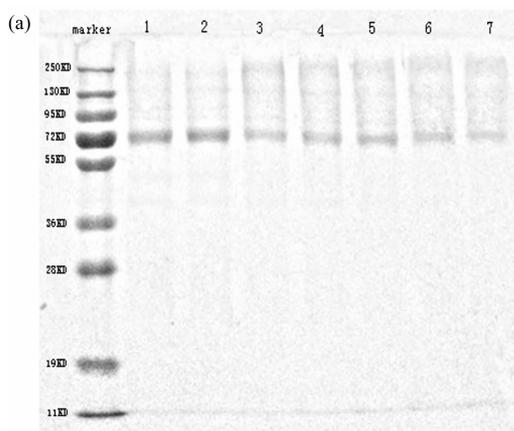
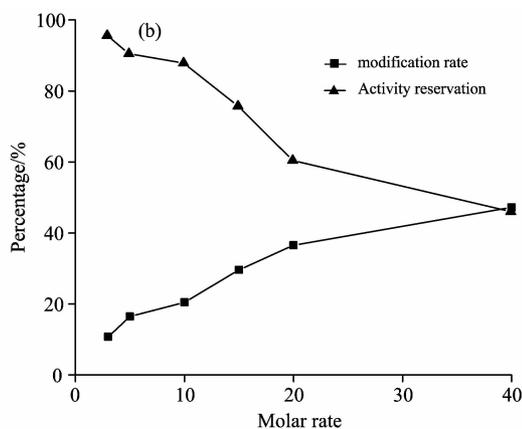
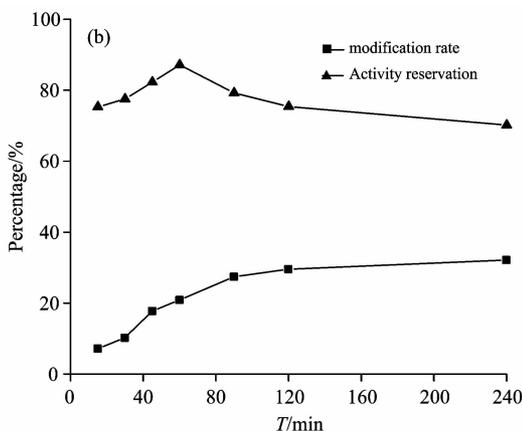


Fig. 3 Effects of different modified time on the efficiency of IgY modification

(a): Results of SDS-PAGE, 1-7 bonds corresponding to modified times 15 min, 30, 45, 60, 90, 120, 240 min ;  
(b): Effects of different modified times on the modification rate and activity reservation of IgY modification



### 2.2.3 缓冲液 pH 对 IgY 修饰效果的影响

图 4(a) 为不同缓冲液 pH 条件下 IgY 修饰效果的 SDS-PAGE 电泳图, 图 4(b) 为不同缓冲液 pH 条件下 IgY 的修饰率以及活性保持率测定结果图。由图 4 可以看出, 不同 pH 条件下 IgY 的 mPEG 化学修饰效果差别较大, pH 在 8.0 和 9.0 时修饰率明显高于在酸性条件下的修饰率, 即酸性环境下不易于 mPEG 的化学修饰, 中性或者偏碱性条件下较利于修饰作用的进行, 所得产物修饰度较高; 然而高的修饰率也

PAGE 电泳图, 图 3(b) 为不同修饰时间条件下 IgY 的修饰率以及活性保持率测定结果图。由图 a 可知, 反应前 30 min, IgY 变化不大, 随着反应时间的延长 70 KD 处的条件逐渐变浅, 2 h 后接近于消失。在 IgY 轻链 25 KD 出几乎看不到条带的存在。由图 b 可以看出, 在反应开始的 1 h 以内, IgY 的修饰率呈明显上升趋势, 并且活性出现增强现象; 当反应 1 h 之后, 修饰率增加缓慢并且活性保持率降低。所以确定最佳反应时间为 1 h, 所得 mPEG-IgY 的修饰率为 87.16%、活性保持率为 20.85%。

带来了较大幅度的 IgY 活性降低。考虑到 IgY 活性不至于过低选用 pH 7 为最佳反应 pH, 可得修饰率为 20.32%、活性保持率为 87.56% 的 mPEG-IgY。

mPEG 对 IgY 的化学修饰结果显示, 氨基修饰程度与 IgY 活性之间存在相关性, 这可能是由于 mPEG 的空间位阻效应, 不利于高修饰率 IgY 活性的发挥。

通过对各种修饰条件的摸索和比较, 最后筛选出最佳修饰条件为: IgY 与活化后的 mPEG 按摩尔比 1 : 10, 缓冲液

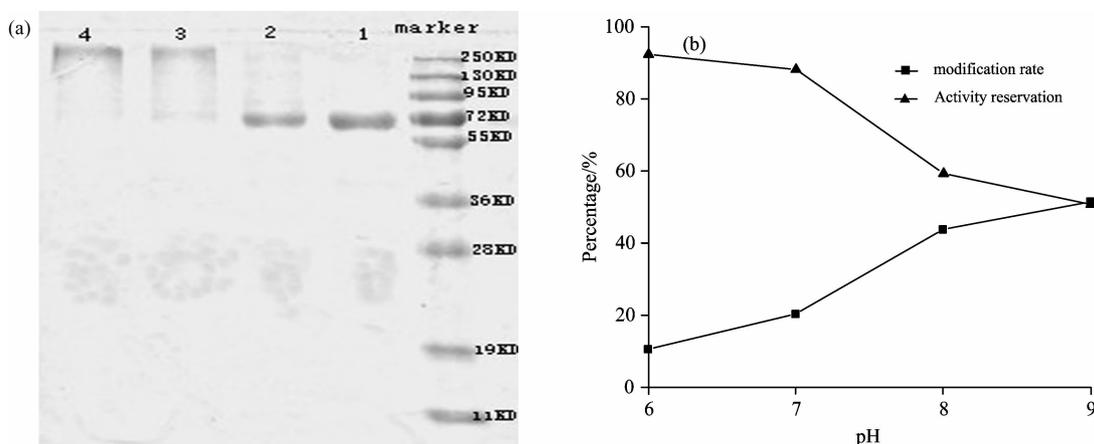


Fig. 4 Effects of different pH on the efficiency of IgY modification

(a): Results of SDS-PAGE, 1-4 bonds corresponding to pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0;

(b): Effects of different pH conditions on the modification rate and activity reservation of IgY modification

pH 7, 修饰时间为 1 h, 最终可得修饰率为 20.56%、活性保持率为 87.62% 的 mPEG-IgY。后续实验所使用的 mPEG-IgY 均在此修饰条件下制备而得。

### 2.3 IgY 以及 mPEG-IgY 红外光谱分析

图 5(a) 和 (b) 分别为 IgY、mPEG-IgY 的红外光谱扫描图, 由图可知在 2 447.89, 1 394.04, 1 162.18, 859.04  $\text{cm}^{-1}$  附近出现琥珀酰胺特有峰, 说明 IgY 经过 NHS-mPEG 修饰后基团成功连接。用红外分析软件对 IgY 以及 NHS-mPEG 修饰后的 IgY 二级结构进行分析, 结果如图 6 所示。

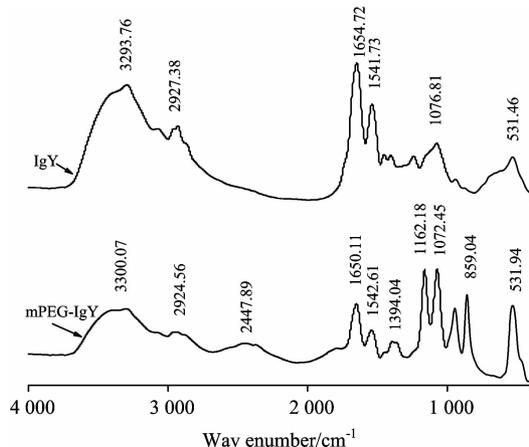


Fig. 5 FTIR spectra of IgY and mPEG-IgY

经分析可知, 修饰前的 IgY 二级结构中  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -Turn, Random 分别为 14.5%, 42.1%, 6.2%, 37.2%; 修饰后的 mPEG-IgY 各二级结构含量分别为 9.1%, 44.9%, 7.4%, 38.6%。与修饰前相比, mPEG-IgY 的  $\alpha$ -螺旋含量降低了约 37%,  $\beta$ -螺旋含量升高, 其他含量变化不明显。

### 2.4 mPEG 修饰对 IgY 热稳定性的影响

蛋白质的二级结构是指多肽链骨架中局部肽段的构象,  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠结构中存在较多氢键, 导致规则二级结构具有一定的刚性, 即蛋白质分子的稳定性很大程度上取决于分

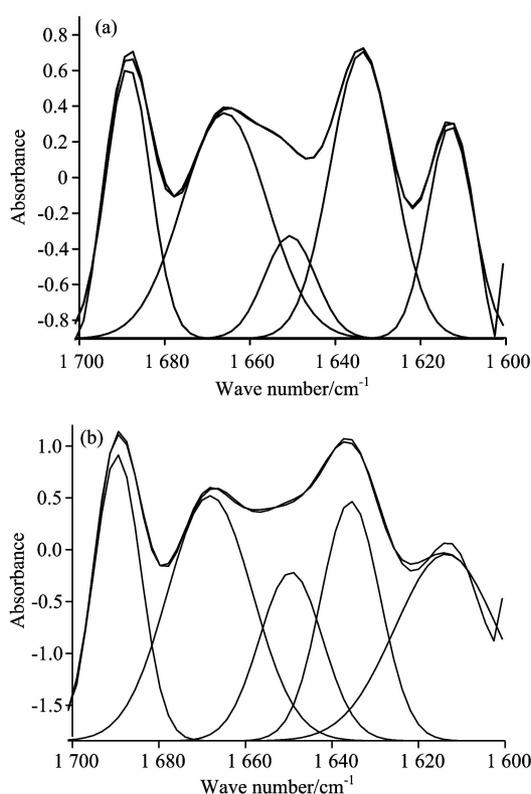


Fig. 6 FTIR spectra secondary structure of IgY (a) and mPEG-IgY (b)

子内部氢键的大小, 因此可以通过计算二级结构的含量来表征蛋白质经过各种处理之后的稳定性变化。

图 7(a) 和 (b) 分别是 IgY、mPEG-IgY 在 70  $^{\circ}\text{C}$  水浴中温育 120 min 的圆二色光谱。对 IgY 和 mPEG-IgY 二级结构进行对比分析可知(插图所示)两种蛋白质 70  $^{\circ}\text{C}$  下经过 120 min 处理后, IgY 的  $\alpha$ -螺旋含量降低了 89.3%, 而修饰后的 IgY 减少 10%; 经过加热处理后  $\beta$  折叠有所增加, IgY 以及 mPEG-IgY 增幅分别为 21.4% 和 32.7%;  $\beta$ -转角含量最少, 处理之后也表现出变化来, 未经修饰 IgY 的  $\beta$ -转角含量由最

初 7.2% 降至 5.3%，经过修饰后的 IgY 由 6.2% 降至 5.8%；另外自由卷曲的含量均呈增加趋势。

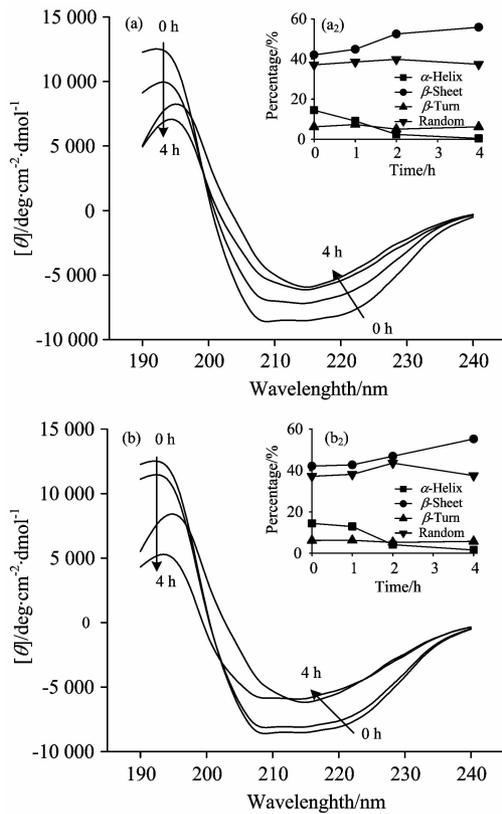


Fig. 7 Circular dichroism spectra of IgY and mPEG-IgY treated with at different times at 70 °C

(a): IgY; (b): mPEG-IgY

## 2.5 mPEG 修饰对 IgY 酸碱稳定性的影响

### 2.5.1 圆二色光谱扫描

图 8(a) 和 (b) 分别是 IgY、mPEG-IgY 在 pH 4 条件下的圆二色光谱图(A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>)和二级结构分析结果(插图所示)。光谱结果经软件处理可知 IgY 的 α 螺旋含量降低了 76.4%，而修饰后的 IgY 减少 15.7%；IgY 以及 mPEG-IgY 的 β 折叠含量均有所增高，增幅分别为 18.4% 和 29.7%。

图 9(a) 和 (b) 分别是 IgY 以及 mPEG-IgY 在 pH 11 条件下的圆二色光谱图和二级结构分析结果图(插图所示)。光谱结果经软件处理可知 IgY 的 α 螺旋含量降低了 71.1%，而修饰后的 IgY 减少 14.9%；IgY 以及 mPEG-IgY 的 β 折叠含量均有所增高，增幅分别为 16.5% 和 21.7%；IgY 较修饰之后的无规则卷曲的增幅更大。

以上研究结果表明，温度以及酸碱作用可以使得蛋白质二级结构 α 螺旋、β 折叠、β 转角和无规则卷曲含量发生变化。由于蛋白质分子的稳定性很大程度上取决于分子内部氢键的大小，也就是说取决于 α 螺旋、β 折叠的含量。分析可知，免疫球蛋白在经过温度以及酸碱处理后，α 螺旋含量成降低趋势，β 折叠含量有增加的趋势，总体含量呈现降低；但是 mPEG-IgY 与 IgY 相比，降低的幅度更小，所以表现出更大的稳定性。

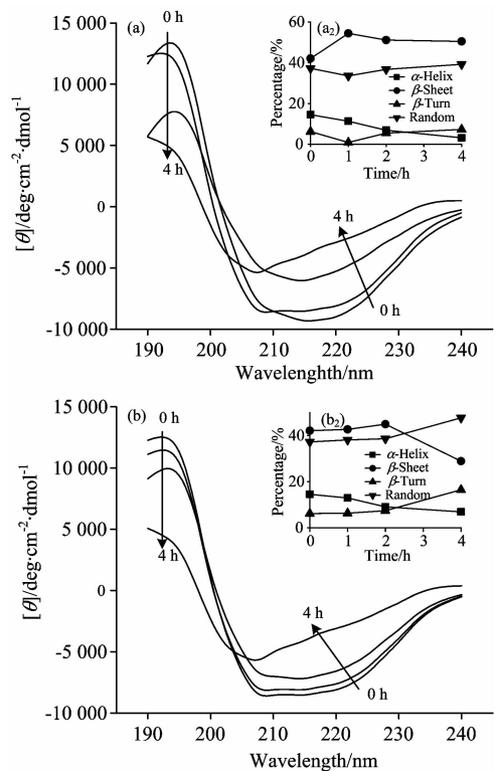


Fig. 8 Circular dichroism spectra of IgY and mPEG-IgY (pH 4) with different treated times

(a): IgY; (b): mPEG-IgY

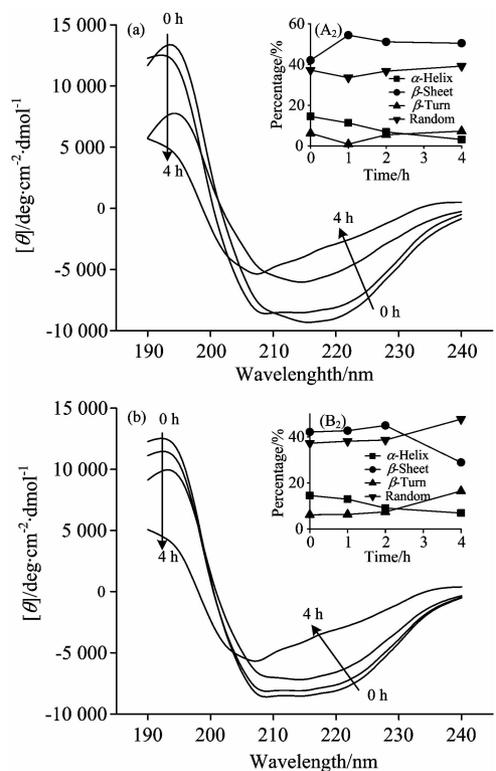


Fig. 9 Circular dichroism spectra of IgY and mPEG-IgY (pH 11) with different treated times

(a): IgY; (b): mPEG-IgY

### 2.5.2 荧光光谱扫描

蛋白质分子中能发射荧光的氨基酸有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)以及苯丙氨酸(Phe), Trp 和 Phe 残基是高度疏水的非极性基团,一般位于分子内部。蛋白质结构的稳定性很大程度上取决于分子内的疏水作用,当外部环境改变时,蛋白质分子的疏水/亲水平衡也会改变,从而影响最大发射波长。因此通过荧光光谱检测处于不同环境中蛋白质最大发射波长,可以得知环境因素对蛋白质构象的影响。

**Table 1 Maximum emission wavelength of IgY and mPEG-IgY**

pH		Maximum emission wavelength/nm			WNC
		1 h	2 h	3 h	
3	IgYmPEG-IgY	336	339	344	9
		334	337	339	5
4	IgYmPEG-IgY	334	336	337	4
		333	334	335	2
10	IgYmPEG-IgY	333	335	337	4
		334	334	335	1
11	IgYmPEG-IgY	335	338	343	8
		333	336	336	3

WNC: Changes of the maximum emission wavelength

由荧光扫描图谱分析可知,随着培育时间的延长,IgY 以及 mPEG-IgY 最大发射波长发生红移,荧光强度也呈现增加趋势。在实验 pH 条件下 37 °C 温育 4 h 后,对照表 1 所列出的最大发射波长改变量(WNC)可知,mPEG-IgY 的最大发射波长红移程度均小于 IgY 的改变。

## 3 结 论

经过对各修饰条件的摸索优化最终确定了 mPEG 对 IgY 进行化学修饰的最佳修饰条件,即 IgY 与 mPEG 摩尔比为 1:10、pH 值为 7、反应时间为 1 h,所得产物 mPEG-IgY 的修饰率为 20.56%,活性保持率为 87.62%。

经光谱分析可知,70 °C 温育 120 min 后,IgY 的  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -Turn, Random 各二级结构含量由 14.5%, 42.1%, 6.2%, 37.2% 变为 1.6%, 55.25%, 5.8%, 37.5%; mPEG-IgY 的各二级结构含量由 12.9%, 42.7%, 6.3%, 38.1% 变为 3.1%, 50.5%, 7.2%, 39.2%; 同样 IgY 与 mPEG-IgY 经过酸碱处理后,mPEG-IgY 比天然 IgY 二级结构变化更小。表明修饰后 mPEG-IgY 对温度、酸碱处理所引起的变性有着更强的稳定性。

## References

- [1] Loeken M R, Roth T F. *Immunology*, 1983, 49(1): 21.
- [2] Da Silva W D, Tambourgi D V. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 135: 173.
- [3] TAO Wei-sun, SUN Wei, JIANG Yong-ming(陶慰孙, 孙 惟, 姜涌明). *The Foundation of Protein Molecule(蛋白质分子基础)*. Beijing: Higher Education Press(北京: 高等教育出版社), 1995.
- [4] Piskarev V E, Navrátil J, Karásková H, et al. *Biochemical Journal*, 1990, 270: 755.
- [5] Veronese F M, Pasut G. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(21): 1451.
- [6] TIAN Shuo, XU Chen, YAO Wen-bing(田 硕, 徐 晨, 姚文兵). *China Biotechnology(中国生物工程杂志)*, 2010, 30(5): 122.
- [7] Veronese F M. *Biomaterials*, 2001, 22: 405.
- [8] Akita E M, Nakai S. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 160(2): 207.
- [9] WANG Li-ying, MA Mei-hu, CAI Zhao-xia, et al(王丽英, 马美湖, 蔡朝霞, 等). *Chinese Journal of Chromatography(色谱)*, 2012, 1(30): 80.
- [10] Sousa C M, Miranda R M, Freire R B. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2011, 54(4): 643.
- [11] Weiner L, Shin I, Shimon J W L, et al. *Protein Science*, 2008, 18: 196.
- [12] Talia M, Wilchek M. *Bioconjugate Chemistry*, 1993, 4: 586.
- [13] Kanako K, Naomi T, Yoshiki S. *Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33(7): 1253.
- [14] LI Shan-shan, WANG Jia-qi, WEI Hong-yang, et al(李珊珊, 王加启, 魏宏阳, 等). *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering(农业工程学报)*, 2008, 24(S2): 283.
- [15] Wittenboer A, Niemeijer B, Karmee S K, et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 67: 208.

## Study on the Stability of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin (IgY) Modified with mPEG

WANG Li-ying, MA Mei-hu\* , HUANG Qun, SHI Xiao-xia

National R. & D. Center for Egg Processing, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The objective of the present paper was to study the effect of monomethoxypolyethylene glycol (mPEG) modification on the stability of chicken IgY and compare the stability of the modification products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), CD spectroscopy and fluorescence spectroscopy. NHS-mPEG was used to modify IgY after mPEG was activated with N-hydroxysuccinimide (NHS). The optimal reaction condition for modification was 1 : 10 molar rate of IgY to mPEG at pH 7, reaction for 1 h, and the product was obtained with modification rate of 20.56% and activity reservation of 87.62%. In addition, the thermal and pH stability of IgY and mPEG-IgY was compared by spectroscopic methods. The results showed that the  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turn, and random content of IgY changed from 14.5%, 42.1%, 6.2% and 37.2% to 1.6%, 55.25%, 5.8% and 37.5%, while mPEG changed from 12.9%, 42.7%, 6.3% and 38.1% to 3.1%, 50.5%, 7.2% and 39.2%, respectively, after incubating for 120 min at 70 °C. For the treatment with acid-base, similarly, the structure changes of mPEG-IgY were smaller than IgY. Thus, it is indicated that IgY modified by mPEG had greater stable properties.

**Keywords** Monomethoxypolyethylene glycol; Chicken egg yolk immunoglobulin(IgY); Chemically modification; Spectral analysis; Stability

(Received Mar. 11, 2012; accepted May 30, 2012)

\* Corresponding author