

تولید آنتیبادی ضد IgG انسان در مرغ و تخلیص آن از زرده به

روش کروماتوگرافی جذبی

شهلا کرانی¹، دکتر علی مصطفایی²، دکتر زهیر حسن³، عباس رستمیان⁴، نسیم خزایی⁵

- 1- مربی بیوشیمی گروه بیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
- 2- دانشیار ایمونولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (مؤلف مسئول) amostafaie@kums.ac.ir
- 3- استاد ایمونولوژی گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
- 4- مربی زیست شناسی سلولی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
- 5- مربی بیوشیمی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده

زمینه و هدف: زرده تخم مرغ منبعی سرشار و قابل دسترس از ایمونوگلوبولین Y (IgY) است، که امکان استفاده از آن در تشخیص طبی و درمان علیه عوامل میکروبی وجود دارد. در مطالعه حاضر با این‌سازی مرغ علیه IgG انسان، آنتیبادی اختصاصی علیه این آنتیژن تولید و از زرده تخم مرغ خالص گردید.

روش بررسی: پس از این‌سازی مرغ علیه IgG خالص انسانی، IgY اختصاصی از زرده با روش محلول‌سازی در آب مقطر اسیدی استخراج و با روش‌های ترسیب توسط پلی‌اتیلن گلیکول 6000 (PEG) و کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد. برای تخمین وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک محصول، به‌ترتیب از روش‌های الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) و ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) و برای اندازه‌گیری فعالیت آن از آزمون الیزا استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که IgY ضد IgG انسان با راندمان بیش از 75 درصد و خلوص نزدیک به 99 درصد بدست آمده است. بعلاوه، وزن مولکول کامل IgY معادل 190 و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به‌ترتیب 27 و 67 کیلودالتون تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری: محصول مطالعه حاضر می‌تواند در اندازه‌گیری آنتیبادی از کلاس IgG در تشخیص انواعی از بیماری‌ها بکار رود.

کلید واژه‌ها: IgY، IgG انسان، کروماتوگرافی جذبی، تخلیص
وصول مقاله: 84/2/18 اصلاح نهایی: 84/7/26 پذیرش مقاله: 84/9/22

استافیلوکوک را ندارد (4-5).
سیستم کمپلمان را فعال
نی‌سازد (6-7)

و به فاکتور روماتوئیدی (RF)
وصل نمی‌شود (8). بعلاوه IgY
از نظر وزن مولکولی، نقطه
ایزوالکتریک و میل اتصال نیز
با IgG پستانداران تفاوت دارد
(9-10).

تفاوت فیلوژنی آنتیژن‌های
بدن پرنده با بسیاری از
آنتیژن‌ها از جمله آنتیژن‌های

IgY عمده‌ترین کلاس آنتیبادی
در سرم پرندگان است. نام این
کلاس آنتیبادی به دلیل فراوانی
آن در زرده است (1-2). IgY از
نظر ساختمان و عملکرد،
تفاوت‌های قابل توجهی با
ایمونوگلوبولین‌های
پستانداران از جمله IgG دارد
(3).

برای مثال این آنتیبادی
قابلیت اتصال به پروتئین G
استرپتوکوک یا پروتئین A

ادجوان کامل فروند (سیگما) اضافه و بخوبی مخلوط گردید تا امولسیون غلیظی از آن تهیه شد. به هر مرغ 0/5 میلی‌لیتر از مخلوط آنتی‌ژنی در چندین نقطه از بدن به صورت زیر پوستی و درون عضله (عضله سینه) تزریق گردید. سه تزریق یادآور از آنتی‌ژن در ادجوان ناقص فروند (سیگما) به فواصل سه هفته‌ای انجام گرفت. پس از اطمینان از ایمن‌سازی مناسب مرغ‌ها (با روش الیزا که شرح آن در بخش‌های بعدی خواهد آمد)، تخم مرغ‌ها روزانه جمع‌آوری و در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج IgY از زرده

استخراج IgY از زرده به روش آکیتا و ناکایی انجام گرفت (12). برای این‌کار ابتدا زرده تخم مرغ ازسفیده آن، جدا و با آب دیونیزه شسته شد. سپس غشای محافظ آن جدا و دور انداخته شد. زرده 10 بار با محلول اسیدکلریدریک سه میلی‌مولار سرد، رقیق گردید تا سوسپانسیونی با pH نهایی پنج بدست آمد. سوسپانسیون حاصله مدت شش ساعت در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس به مدت 30 دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد در $15000 \times g$ سانتریفوژ گردید. محلول رویی از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و برای مراحل بعد نگهداری شد.

خالص‌سازی IgY

مرحله اول خالص‌سازی IgY ترسیب با پلی‌اتیلن‌گلیکول 6000 (مرک) بود که با تغییراتی نسبت به روش پولسن (20) انجام گرفت. برای این‌کار، از محلول

پستانداران، این امکان را می‌دهد که پاسخ هومورال مناسبی در مرغ علیه این آنتی‌ژنها القا نمود و آنتی‌بادی با تیترو تمایل بیشتری نسبت به میزبانهای پستاندار تولید کرد (11-6). بعلاوه تولید آنتی‌بادی از زرده، محصول عمل بیشتری نسبت به تولید آنتی‌بادی در حیوانات آزمایشگاهی دارد (12) و نیازمند استفاده از روشهای تهاجمی مانند خونگیری و استرس بر حیوان و آزمایشگر نیست (13). از سالها پیش تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از IgY به اهداف تشخیصی و همچنین استفاده درمانی آن علیه انواع عفونی بیماری‌های عوامل عفونی صورت گرفته است (16-14). با توجه به اهمیت روزافزون IgY، محققین روشهای مختلفی برای تولید این نوع آنتی‌بادی در مرغ و تخلیص آن از زرده تخم مرغ یافته‌اند (4 و 11 و 17-19). تفاوت این روشها که عمدتاً بر پایه اشکال مختلف کروماتوگرافی طراحی شده‌اند، در درجه خلوص و راندمان محصول عمل می‌باشد. به دلیل اهمیت اندازه‌گیری IgG در تشخیصی، در این مطالعه آنتی‌بادی ضد آن در مرغ تولید گردید و این آنتی‌بادی از زرده تخلیص و تعیین خصوصیت گردید.

روش بررسی

ایمن‌سازی مرغ‌ها: IgG خالص انسان (سیگما) در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات نمکی (PBS) حل و با فیلتر 0/2 میکرون استریل گردید. به یک حجم از محلول IgG یک حجم

ستون شیشه‌ای مناسب ریخته شد. سپس با مقدار کافی از PBS شسته شد تا به تعادل رسید. رسوب حاوی IgY در غلظت 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS حل گردید و در هر آزمون حدود 200 میلی‌گرم از آن با سرعت 10 میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون شد. پس از ورود نمونه، جریان PBS با سرعت 20 میلی‌لیتر در ساعت بر ستون برقرار گردید. پس از رسیدن جذب مایع خروجی به حدود صفر (در طول موج 280 نانومتر) بافر گلیسین 0/1 مولار با pH 2/8 با سرعت 10 میلی‌لیتر در ساعت بر ستون اعمال شد. مایع خروجی در حجم‌های 2 میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش که قبلاً مقدار 0/2 میلی‌لیتر بافر تریس-HCl یک مولار با pH 8 در آنها ریخته شده بود، جمع‌آوری گردید.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

غلظت پروتئین به روش UV اندازه‌گیری گردید (21). در این روش جذب نمونه‌ها در طول موج‌های 280 و 260 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (شیماتزو، ژاپن) اندازه‌گیری و غلظت پروتئین طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\left(\frac{0.76 \times \text{جذب}}{260} - \frac{1.55 \times \text{جذب}}{280}\right)$$

نانومتر) = (mg/ml) غلظت پروتئین
غلظت IgY خالص نیز به روش uv طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

ضریب خاموشی IgY / جذب در 280 نانومتر = (mg/ml) غلظت پروتئین
ضریب خاموشی IgY خالص

$$\varepsilon = 1.4 \frac{\text{cm}^{-1} \text{mg}^{-1}}{\text{ml}} \quad (22)$$

الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات

PEG 40 درصد در آب مقطر، به عصاره پروتئینی حاوی IgY اضافه شد تا غلظت نهایی PEG در آن به 12 درصد رسید. اینکار در دمای اتاق و روی همزن مغناطیسی انجام گرفت. مخلوط حاصله به مدت 30 دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد در 10000×g سانتریفوژ گردید. رسوب از مایع رویی جدا و برای مرحله بعدی نگهداری شد.

مرحله نهایی تخلیص IgY با استفاده کروماتوگرافی جذبی که واجد لیگاند IgG انسانی بود، انجام گرفت. برای اینکار دو گرم سفاروز 4 بی فعال‌شده با سیانوژن برمید (فارماسیا) سه بار هر بار با 100 میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک میلی‌مولار شسته شد تا متورم گردید. برای رسوب دادن ژل از سانتریفوژ (800×g به مدت 10 دقیقه) استفاده شد.

15 میلی‌لیتر محلول IgG خالص انسانی در غلظت 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر کربنات 0/1 مولار با pH=8/5 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار به ژل اضافه شد. مخلوط، 2 ساعت در دمای اتاق بر روی روتاتور با حرکت آرام قرارگرفت. سپس به آن 100 میلی‌لیتر محلول گلیسین 0/2 مولار با pH=8 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار اضافه گردید و برای حداقل 2 ساعت در دمای اتاق قرارگرفت. مایع رویی دکانته شد و ژل 5 بار به طور متناوب با دو نوع بافر استات 0/1 مولار با pH 4 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار و تریس 0/1 مولار با pH 8 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار شسته شد. ژل حاصله در یک

پلیت‌ها پنج بار با PBS-T شسته شد. در مرحله بعد 100 میکرولیتر آنتی‌بادی خرگوشی ضد IgY (گونژوگه با آنزیم پراکسیداز از شرکت سیگما) که 40000 بار با PBS-T رقیق شده بود، به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پلیت‌ها پنج بار با محلول PBS-T شسته شد و در نهایت 100 میکرولیتر از سوبسترای تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (داکو) به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش پس از 15 دقیقه با افزودن 50 میکرولیتر اسید سولفوریک پنج درصد متوقف گردید و جذب چاهک‌ها در 450 نانومتر توسط الایزا ریدر (Bio-TEK instruments) خوانده شد.

ایزووالکتروفوکوسینگ

ایزووالکتریک فوکوسینگ به روش آبگری مجدد در محدوده 8-4 pH انجام گرفت (24، 25). برای این کار، ژل پلی‌آکریل آمید در غلظت 4/2 درصد در عدم حضور آمفولیت‌ها و مواد حل‌کننده پروتئین بر روی طلق‌های قابل اتصال به ژل (GelBond PAG film) تهیه شد و پس از شستشو و خشک‌کردن، در حضور اوره 9 مولار، CHAPS دو درصد، آمفولیت 6 درصد (v/v) (به نسبت مساوی از آمفولین 4-6/5 و 8-5) و DTT 20 میلی‌مولار مجدداً متورم گردید. نمونه‌ها در بافر حل‌کننده حاوی اوره 9 مولار، CHAPS 4 درصد، آمفولیت 2 درصد (به نسبت مساوی از آمفولین 4-6/5 و 8-5) و DTT 80 میلی‌مولار حل شد. نمونه‌گذاری با کاغذهای نمونه‌گذاری در نزدیکی کاتد انجام گرفت. قبل

SDS-PAGE غیراحیایی بر اساس روش لاملی (23) در ژل جداکننده 10 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد و SDS-PAGE احیایی در ژل جداکننده 13/5 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد انجام گرفت. چهار حجم نمونه به یک حجم بافر نمونه (5x) افزوده شد و پنج دقیقه در آب جوش قرار گرفت. 10 میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و در ولتاژ ثابت 150 ولت الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی R-350 (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد. در موارد لازم، تراکم و درصد باندهای پروتئین در ژل با دستگاه تراکم‌سنج (هلنا) تعیین گردید.

اندازه‌گیری فعالیت IgY با آزمون الایزا

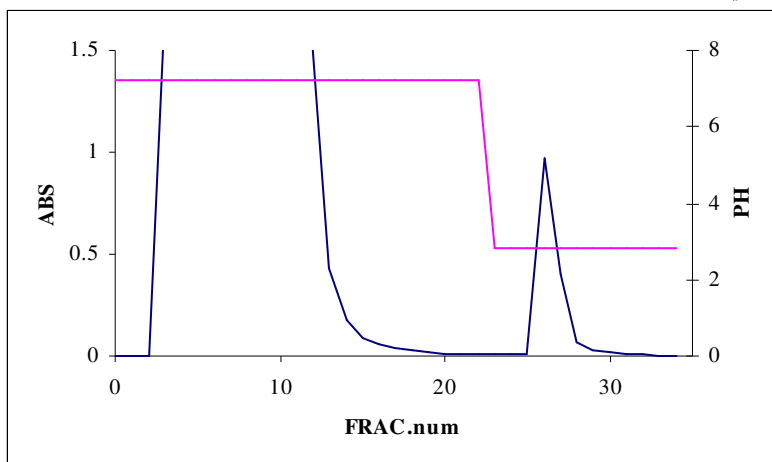
فعالیت آنتی‌بادی ضد IgG با روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای اینکار، به هر چاهک میکروپلیت (نانک) 100 میکرولیتر از محلول IgG انسانی با غلظت 10 میکروگرم در میلی‌لیتر در PBS اضافه گردید. میکروپلیت‌ها به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از زمان فوق، محتوای چاهک‌ها تخلیه و 250 میکرولیتر PBS حاوی توین بیست 0/5 درصد اضافه شد و پلیت‌ها 15 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پلیت‌ها سه بار با محلول PBS حاوی توین بیست 0/05 درصد (PBS-T) شسته شد. 100 میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده با PBS-T به حالت دوبله به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد.

تشکیل می‌دهد. بعد از کروماتوگرافی جذبی که نتیجه آن در شکل 1 آمده است، 4-5 درصد بخش IgY موجود در عصاره به ستون چسبید. این کروماتوگرام حاوی دو قله پروتئینی عمده بود. قله اول که همراه با فر شوینده از ستون خارج گردید، مربوط به پروتئینهای عصاره زرده غیر از آنتیبادی ضد IgG انسان است. قله دوم که بعد از تغییر pH توسط گلیسین از ستون خارج گردید، مربوط به IgY ضد IgG انسان است که 4-5 درصد محتوای IgY و حدود 0/5 درصد محتوای پروتئینی زرده را تشکیل می‌دهد.

از نمونه‌گذاری، ژل برای مدت 20 دقیقه در ولتاژ 700 ولت الکتروفورز گردید. پس از نمونه‌گذاری، الکتروفورز در سه مرحله صورت گرفت. ابتدا مرحله نفوذپذیری به مدت 60 دقیقه در شیب ولتاژ 500 - 0/0 ولت صورت گرفت. سپس کاغذهای نمونه‌گذاری برداشته شد و ژل به مدت 4 ساعت در ولتاژ 2500 ولت (مرحله جداسازی) و سپس 20 دقیقه در ولتاژ 3000 ولت (نازک شدن باندها) الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با کوماسی 250-G رنگ‌آمیزی شد (23).

یافته‌ها

با توجه به غلظت تام پروتئین و مقدار نسبی IgY در عصاره اسیدی زرده، معلوم گردید که IgY 15-17 درصد محتوای پروتئینی این عصاره را

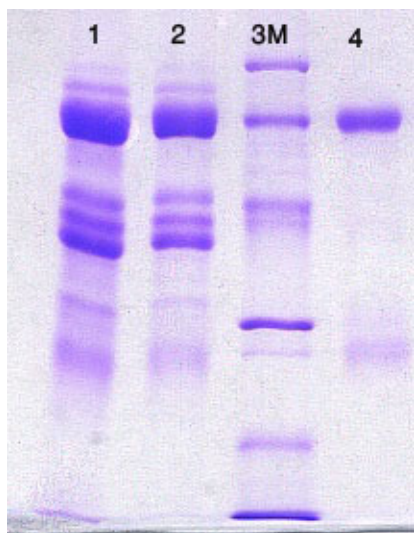


شکل 1: کروماتوگرافی جذبی عصاره زرده در ستون سفاروز 4بی حاوی لیگاند IgG انسان

در مقایسه با فراکسیون PEG را نشان می‌دهد. ستون 1 در این شکل مربوط به پروتئین‌های ترسیب نموده توسط PEG است که حاوی چندین باند پروتئین پرمقدار و

الکتروفورز مربوط به دو قله حاصل از کروماتوگرافی جذبی در اشکال 3 و 2 آمده است. شکل 2 الکتروفورز غیراحیایی محتوای این دو قله

ستون 3 این شکل مربوط به محتوای قله دوم کروماتوگرافی جذبی است که به صورت دو باند مشخص دیده می‌شود. این دو باند که مربوط به زنجیره‌های سبک و سنگین IgY است، در مقایسه با مارکرهای وزنی پایین (فارماسیا) به ترتیب در موقعیت 67 و 27 کیلو دالتون قرار دارند. این نوع الکتروفورز نیز خلوص محصول بدست‌آمده را به وضوح نشان می‌دهد.



شکل 3: SDS-PAGE احیایی پروتئین‌های فراکسیون PEG (ستون 1)، قله اول (ستون 2) و قله دوم (ستون 3) کروماتوگرافی جذبی. ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان 14/4، 20، 30، 45، 67، 97 است.

بررسی راندمان فعالیت محصول IgY با روش الیزا نشان داد که محصول بدست آمده بیش از 75 فعالیت تام آنتی‌بادی دارا می‌باشد.

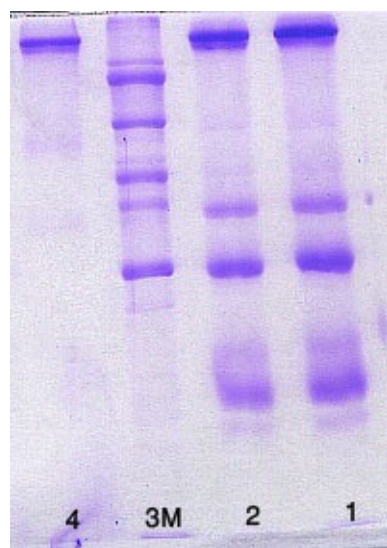
الگوی IEF پروتئین‌های عصاره در مقایسه با IgY بدست آمده به روش‌های کروماتوگرافی جذبی در شرایط واسرشته‌کننده در دامنه pH 4-8 آمده در شکل 4 آمده است. در این شرایط زنجیره سنگین و سبک IgY به صورت

انواعی از پروتئین‌های کم مقدار است.

ستون 2 مربوط به قله اول و شامل تقریباً تمام پروتئین‌های ترسید شده توسط PEG می‌باشد و الگوی آن شباهت زیادی با ستون 1 دارد.

ستون 3 مربوط به بخش جذب‌شده به ستون جذبی است که به صورت یک باند در موقعیت وزنی 190 کیلو دالتون در مقایسه با مارکرهای وزن مولکولی بالا (فارماسیا) دیده می‌شود.

نتایج تراکم‌سنجی نشان داد که خلوص این پروتئین از 16/4 درصد در فراکسیون PEG (ستون 1) به نزدیک 99 درصد در کروماتوگرافی جذبی رسیده است (ستون 4) و ناخالصی آن نا محسوس است.



شکل 2: SDS-PAGE

غیراحیایی پروتئین‌های فراکسیون PEG (ستون 1)، قله اول (ستون 2) و قله دوم (ستون 3) کروماتوگرافی جذبی. ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان 53، 76، 116، 170، 212 کیلو دالتون است.

در شکل 3 الکتروفورز احیایی نمونه‌ها آمده است.

ایزوالکتريک آنها در شرایط آزمایش است.

دو منطقه منتشره، به ترتیب در محدوده pH 4/8-5/1 و pH 5/2 دیده می‌شوند. با توجه به پلی‌کلونال بودن آنتیبادی، بخش عمده این دو زنجیره به صورت دو باند مشخص، به ترتیب در pH 5 و pH 5/25 قرار دارد که بیانگر نقاط



شکل 4: ایزوالکتريک فوکوسینگ پروتئين‌هاي فراکسيون PEG (ستون بالا)، محصول کروماتوگرافي جذبي (ستون پايين) و مارکرهاي محدوده باز (فارماسيا) (ستون وسط).

پروتئين‌هاي آبدوست از جمله IgY از زرده تخم مرغ است (17). با افزودن روش ترسيب با PEG در این مطالعه که بر اساس روش پولسن انجام گرفت (20)، بخش حاوي IgY به شکل مطلوبی رسوب کرد و ادامه کار را ساده‌تر نمود. از جمله مزيتهاي استفاده از PEG برای رسوبدهي پروتئين‌ها امکان کاربرد این ماده رسوب‌دهنده در دماهاي بالاتر از صفر درجه سانتیگراد، بدون احتمال واسرشته‌شدن پروتئين‌ها می‌باشد (26، 27). بعلاوه در روش ترسيب با PEG بر خلاف ترسيب توسط نمک، رسوب حاصله نیازی به دیالیز ندارد و ادامه تخليص با انواع کروماتوگرافي سازگار است. لازم به توضیح است که استخراج IgY تنها براساس روش پولسن، راندمان مطلوبی ندارد و

بحث

IgY عمده‌ترین کلاس آنتیبادی در سرم پرندگان است که تفاوت ساختمانی و عملکردی زیادی با IgG پستانداران دارد (4-10). فراواني این آنتیبادی در زرده، عدم نیاز به روشهاي تهاجمي مانند خونگیری و

امکان تولید آن بر علیه انواعی از آنتیژنها باعث شده تا به عنوان منبع مهم و قابل توجهی برای تولید آنتیبادی مطرح شود (9-13). در مطالعه حاضر با ترکیبی از دو روش آب مقطر اسیدی و ترسيب با PEG پروتئين‌هاي زرده به نحو مناسبی محلول و از مواد لیپیدی زرده جدا گردید. آکیتا و ناکای نشان داده‌اند که رقیق‌سازی با آب مقطر اسیدی روشی ساده و کارآمد برای استخراج

ناشی از شرایط مطلوبتر این‌سازی مرغ‌ها بوده است. در مطالعه فیچ‌تال و همکاران (18) که از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی برای خالص‌سازی IgY استفاده شد، میزان خلوص 69-60 درصد و راندمان 60-65 درصد گزارش گردید. در مطالعه دیگر، هاتا و همکاران (19) از کروماتوگرافی تعویض آنیونی دی‌اتیل آمینواتیل سفاصل بعد از ترسیب توسط سولفات سدیم را برای تخلیص IgY استفاده کردند. نتیجه مطالعه آنها نشان داد که IgY با درجه خلوص و راندمان، به ترتیب 98 و 73 درصد بدست آمده است. کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) روش دیگری برای خالص‌سازی IgY است که هانسن و همکاران (4) از آن استفاده کردند. لازم به توضیح است که روشهای کروماتوگرافی تعویض یون و تیوفیلیک اگرچه برای تخلیص IgY نام مفید هستند ولی برای تخلیص IgY اختصاصی قابل استفاده نیستند.

نتایج این مطالعه نشان داد، روش بکار رفته برای تخلیص IgY اختصاصی، روشی ساده، با خلوص بالا و با راندمان نسبتاً مناسب است و برای تخلیص IgY اختصاصی علیه سایر آنتی‌ژن‌ها در مقیاس کم یا زیاد عملی است. علاوه مشخص گردید که با این‌سازی مناسب مرغ‌ها می‌توان سهم IgY اختصاصی نسبت به IgY تام را تا حد امکان افزایش داد. چنین نتایجی در کنار مزیت‌های IgY باعث می‌شود تا بتوان از آن به عنوان منبع مناسب و

باعث هدر رفتن بخش قابل توجهی از آن می‌شود (17). پس از کروماتوگرافی جذبی که به عنوان مرحله نهایی تخلیص استفاده شد، محصول IgY اختصاصی با درجه خلوص بسیار بالا (نزدیک به 99 درصد) و راندمان بیش از 75 درصد بدست آمد. بعلاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که وزن مولکول کامل IgY حدود 190 و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به ترتیب 27 و 67 کیلوالتون است. در مقایسه با این نتایج، وردولیوا و همکاران که از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از لیگاند سنتزی (TG19318) برای خالص‌سازی IgY استفاده نمودند، توانستند محصولی با خلوص و راندمان به ترتیب 90 و 98/5 درصد بدست آورند (1). در مطالعه دیگری که توسط کوک و همکاران (11) با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی بعد از ترسیب توسط سولفات آمونیوم انجام گرفت، میزان راندمان آنتی‌بادی حاصله 81 درصد گزارش شد، ولی درجه خلوص گزارش نشد. بعلاوه این محققین نشان دادند که IgY اختصاصی بدست‌آمده نزدیک به یک درصد محتوای IgY زرده بوده است. اگرچه راندمان IgY در مطالعه حاضر از مطالعات کوک و وردولیوا کمتر بوده، ولی خلوص این محصول به میزان قابل توجهی بالاتر از مطالعات مشابه بوده است. بعلاوه نتایج این مطالعه حاکی از آن است 4-5 درصد محتوای IgY زرده را IgY اختصاصی تشکیل می‌دهد. این موضوع احتمالاً

و افري از آنتیبادی با اهداف مختلف استفاده نمود. برای مثال IgY بدست آمده در مطالعه حاضر که علیه IgG انسانی است به اشکال مختلف در تشخیص طبی قابل استفاده می‌باشد.

References

1. Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. *J chromatogr B*. 2000; 749: 233-242.
2. Narat M. Production of antibodies in chickens. A review, *Food technol Biotechnol*. 2003; 41(3):259-267.
3. Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. 3 Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med*. 1969; 130(6):1337-1352.
4. Hansen P, Scoble JA, hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods*. 1998; 215(1-2): 1-7.
5. Kronvall G, Seal US, Finstad J, Williams RCJ. Phylogenetic insight into evolution of mammalian FC fragment of IgG globulin using staphylococcal protein. *AJ Immunol*. 1970; 104: 140-145.
6. Tini M, Jewel UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol*. 2002; 131: 569-574.
7. Larsson A, Wejaker PE, Forsberg P, Lindahl T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods*. 1992; 156(1): 79-83.
8. Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem*. 1991; 37(3): 411-414.
9. Zhang WW. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. A review. *Drug Discov Today*. 2003; 8(8): 364-371.
10. Tu Y-Y, Chen CH-CH, Chang H-M. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. *Food Res International*. 2001; 34:783-789.
11. Cook CL, PAO W, Firea JR, Anderson BE, Fryer JP. Simple purification methods for an α -Galactose-specific antibody from chicken eggs. *J Biosci Bioengi*. 2001; 91(3): 305-310.
12. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. *J Food Sci*. 1992; 57(3): 629-634.
13. Schade R, Schniering A, Hlinak A. Polyclonal avian antibodies and extracted from egg yolk as an alternative to the production of antibodies in mammals. A review. *ALTEX*. 1992; 9(2): 43-56.
14. Toshihiko K, Takahik O, Yoshihiro S, Yoshio N. Immunization against dental caries. A review. *Vaccine*. 2002; 20: 2027-2044.
15. Gürtler M, Fehlhaber K. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk from eggs laid by immunized hens. *Int J Food Microbiol*. 2004; 90: 107-113.
16. Kobayashi CH, Yokoyama H, Nguyen SV, Kodama Y, Kimata T, Izehi M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice. *Vaccine*. 2004; 4652: 1-4.
17. Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* Strain. *J Immunol Methods*. 1993; 160(2): 207-214.
18. Fichtal J, Charter EA, Lo KV, Nakai S. Purification of antibodies from industrial separated egg yolk. *J Food Sci*. 1993; 58(6): 1285-1290.
19. Hatta H, Kim M and Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric Biol Chem*. 1990; 54(10): 2531-2535.
20. polson A, Von Wechmar M.B, Van Reggenortel MHV. Isolation of viral IgY antibodies from egg yolks of immunized hens. *Immunol. Commun*. 1980; 9: 475-493.
21. Roe S. protein purification techniques. 2nd ed. 2001; PP. 28-32.

22. Linden CD, Roth TF. IgG receptors on fetal chick yolk sac. *J Cell Sci.* 1978; 33: 317-328.
23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
24. مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل، چاپ دوم. انتشارات یادآوران. 1382، ص: 61-35.
25. Isoelectric focusing. Principles and methods. Pharmacia fine chemicals. Uppsala, Sweden. 1982; 45-64.
26. Polson A, Potgieter GM, Largier JF, Mears GEF, Joubert FJ. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim Biophys Acta.* 1964; 82: 463-470.
27. Wickerhauser M, Hae YK. Large scale preparation of macroglobulins. *Vox Sang.* 1972; 23: 119-125.