مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي كردستان/ دوره دهم/ تابستان 1384، 18-10

توليد آنتي‌بادي ضد IgG انسان در مرغ و تخليص آن از زرده به روش كروماتوگرافي جذبي

شهلا كراني[1]، دكتر علي مصطفايي[2]، دكتر زهير حسن[3]، عباس رستميان[4]، نسيم خزايي[5]

1- مربي بيوشيمي گروه بيولوژي، واحد علوم و تحقيقات، دانشگاه آزاد اسلامي
2- دانشيار ايمنولوژي مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه (مؤلف مسئول) amostafaie@kums.ac.ir
3- استاد ايمنولوژي گروه ايمونولوژي، دانشكده علوم پزشكي، دانشگاه تربيت مدرس
4- مربي زيست شناسي سلولي مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه
5- مربي بيوشيمي مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي، دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه

چكيده

زمينه و هدف: زرده تخم مرغ منبعي سرشار و قابل دسترس از ايمونوگلوبولينY (IgY) است، كه امكان استفاده از آن در تشخيص طبي و درمان عليه عوامل ميكروبي وجود دارد. در مطالعه حاضر با ايمن‌سازي مرغ عليه IgG انسان، آنتي‌بادي اختصاصي عليه اين آنتي‌ژن توليد و از زرده تخم مرغ خالص گرديد.

روش بررسي: پس از ايمن‌سازي مرغ عليه IgG خالص انساني، IgY اختصاصي از زرده با روش محلول‌سازي در آب مقطر اسيدي استخراج و با روش‌هاي ترسيب توسط پلي‌اتيلن گليگول6000 (PEG) و كروماتوگرافي جذبي تخليص شد. براي تخمين وزن مولكولي و نقطه ايزوالكتريك محصول، به‌ترتيب از روش‌هاي الكتروفورز در ژل پلي‌آكريل آميد (SDS-PAGE) و ايزوالكتريك فوكوسينگ (IEF) و براي اندازه‌گيري فعاليت آن از آزمون الايزا استفاده شد.

يافته‌ها: نتايج نشان داد كه IgY ضد IgG انسان با راندمان بيش از 75 درصد و خلوص نزديك به 99 درصد بدست آمده است. بعلاوه، وزن مولكول كامل IgY معادل 190 و وزن زنجيره‌هاي سبك و سنگين آن به‌ترتيب 27 و 67 كيلودالتون تخمين زده شد.

نتيجه‌گيري: محصول مطالعه حاضر مي‌تواند در اندازه‌گيري آنتي‌بادي از كلاس IgG در تشخيص انواعي از بيماريها بكار رود.

كليد واژه‌ها: IgY، IgG انسان، كروماتوگرافي جذبي، تخليص

وصول مقاله: 84/2/18 اصلاح نهايي: 84/7/26 پذيرش مقاله: 84/9/22

مقدمه

IgY عمده‌ترين كلاس آنتي‌بادي در سرم پرندگان است. نام اين كلاس آنتي‌بادي به دليل فراواني آن در زرده است (2-1). IgY از نظر ساختمان و عملكرد، تفاوتهاي قابل توجهي با ايمونوگلوبولين‌هاي سرم پستانداران از جمله IgG دارد (3).

براي مثال اين آنتي‌بادي قابليت اتصال به پروتئين G استرپتوكوك يا پروتئين A استافيلوكوك را ندارد (5-4). سيستم كمپلمان را فعال نمي‌سازد (7-6)

و به فاكتور روماتوئيدي (RF) وصل نمي‌شود (8). بعلاوه IgY از نظر وزن مولكولي، نقطه ايزوالكتريك و ميل اتصال نيز با IgG پستانداران تفاوت دارد (10-9).

تفاوت فيلوژني آنتي‌ژنهاي بدن پرنده با بسياري از آنتي‌ژنها از جمله آنتي‌ژنهاي

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

پستانداران، اين امكان را مي‌دهد كه پاسخ هومورال مناسبي در مرغ عليه اين آنتي‌ژنها القا نمود و آنتي‌بادي با تيتر و تمايل بيشتري نسبت به ميزبانهاي پستاندار توليد كرد (11-6). بعلاوه توليد آنتي‌بادي از زرده، محصول عمل بيشتري نسبت به توليد آنتي‌بادي در حيوانات آزمايشگاهي دارد (12) و نيازمند استفاده از روشهاي تهاجمي مانند خونگيري و استرس بر حيوان و آزمايشگر نيست (13).

از سالها پيش تحقيقات گسترده‌اي براي استفاده ازIgY به اهداف تشخيص طبي و همچنين استفاده درماني آن عليه انواعي از عوامل عفوني بخصوص عوامل عفوني بيماريهاي روده‌اي صورت گرفته است (16-14). با توجه به اهميت روزافزون IgY، محققين روشهاي مختلفي براي توليد اين نوع آنتي‌بادي در مرغ و تخليص آن از زرده تخم مرغ يافته‌اند (4و 11و 19-17). تفاوت اين روشها كه عمدتاً بر پايه اشكال مختلف كروماتوگرافي طراحي شده‌اند، در درجه خلوص و راندمان محصول عمل مي‌باشد. به دليل اهميت اندازه‌گيري IgG در تشخيص طبي، در اين مطالعه آنتي‌بادي ضد آن در مرغ توليد گرديد و اين آنتي‌بادي از زرده تخليص و تعيين خصوصيت گرديد.

روش بررسي

ايمن‌سازي مرغها: IgG خالص انسان (سيگما) در غلظت يك ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر در بافر فسفات نمكي (PBS) حل و با فيلتر0/2 ميكرون استريل گرديد. به يك حجم از محلول IgG يك حجم ادجوان كامل فروند (سيگما) اضافه و بخوبي مخلوط گرديد تا امولسيون غليظي از آن تهيه شد. به هر مرغ 0/5 ميلي‌ليتر از مخلوط آنتي‌ژني در چندين نقطه از بدن به صورت زير پوستي و درون عضله (عضله سينه) تزريق گرديد. سه تزريق يادآور از آنتي‌ژن در ادجوان ناقص فروند (سيگما) به فواصل سه هفته‌اي انجام گرفت. پس از اطمينان از ايمن‌سازي مناسب مرغها (با روش الايزا كه شرح آن در بخشهاي بعدي خواهد آمد)، تخم مرغها روزانه جمع‌آوري و در دماي4 درجه سانتيگراد نگهداري شد.

استخراج IgY از زرده

استخراجIgY از زرده به روش آكيتا و ناكايي انجام گرفت (12). براي اينكار ابتدا زرده تخم مرغ ازسفيده آن، جدا و با آب ديونيزه شسته شد. سپس غشاي محافظ آن جدا و دور انداخته شد. زرده 10 بار با محلول اسيدكلريدريك سه ميلي‌مولار سرد، رقيق گرديد تا سوسپانسيوني با pH نهايي پنج بدست آمد. سوسپانسيون حاصله مدت شش ساعت در دماي چهار درجه سانتيگراد نگهداري گرديد. سپس به مدت 30 دقيقه در دماي چهار درجه سانتيگراد در 15000×g سانتريفوژ گرديد. محلول رويي از كاغذ صافي واتمن شماره يك عبور داده شد و براي مراحل بعد نگهداري شد.

خالص سازيIgY

مرحله اول خالص‌سازيIgY ترسيب با پلي‌اتيلن‌گليكول6000 (مرك) بود كه با تغييراتي نسبت به روش پولسن (20) انجام گرفت. براي اينكار، از محلول

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

PEG 40 درصد در آب مقطر، به عصاره پروتئيني حاوي IgY اضافه شد تا غلظت نهايي PEG در آن به 12درصد رسيد. اينكار در دماي اتاق و روي همزن مغناطيسي انجام گرفت. مخلوط حاصله به مدت 30 دقيقه در دماي چهار درجه سانتيگراد در 10000×g سانتريفوژ گرديد. رسوب از مايع رويي جدا و براي مرحله بعدي نگهداري شد.

مرحله نهايي تخليص IgY با استفاده كروماتوگرافي جذبي كه واجد ليگاند IgG انساني بود، انجام گرفت. براي اينكار دو گرم سفاروز4 بي فعال‌شده با سيانوژن برميد (فارماسيا) سه بار هر بار با 100 ميلي‌ليتر اسيد كلريدريك يك ميلي‌مولار شسته شد تا متورم گرديد. براي رسوب دادن ژل از سانتريفوژ (800×g به‌مدت 10 دقيقه) استفاده شد. 15ميلي‌ليتر محلول IgG خالص انساني در غلظت 2 ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر در بافر كربنات 0/1 مولار با pH=8/5 حاوي كلريد سديم 0/5 مولار به ژل اضافه شد. مخلوط، 2 ساعت در دماي اتاق بر روي روتاتور با حركت آرام قرارگرفت. سپس به آن100ميلي‌ليتر محلول گليسين 0/2 مولار با pH=8 حاوي كلريد سديم 0/5 مولار اضافه گرديد و براي حداقل 2 ساعت در دماي اتاق قرارگرفت. مايع رويي دكانته شد و ژل 5 بار به طور متناوب با دو نوع بافر استات 0/1 مولار با pH 4 حاوي كلريد سديم 0/5 مولار و تريس 0/1 مولار با pH 8 حاوي كلريد سديم 0/5 مولار شسته شد. ژل حاصله در يك ستون شيشه‌اي مناسب ريخته شد. سپس با مقدار كافي از PBS شسته شد تا به تعادل رسيد. رسوب حاوي IgY در غلظت 10 ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر در PBS حل گرديد و در هر آزمون حدود 200 ميلي‌گرم از آن با سرعت 10ميلي‌ليتر در ساعت وارد ستون شد. پس از ورود نمونه، جريان PBS با سرعت 20 ميلي‌ليتر در ساعت بر ستون برقرار گرديد. پس از رسيدن جذب مايع خروجي به حدود صفر (در طول موج280 نانومتر) بافر گليسين 0/1 مولار با pH 2/8 با سرعت 10 ميلي‌ليتر در ساعت بر ستون اعمال شد. مايع خروجي در حجم‌هاي 2 ميلي‌ليتري در لوله‌هاي آزمايش كه قبلاً مقدار 0/2 ميلي‌ليتر بافر تريس- HCl يك مولار با pH8 درآنها ريخته شده بود، جمع‌آوري گرديد.

اندازه‌گيري غلظت پروتئين

غلظت پروتئين به روش UV اندازه‌گيري گرديد (21). در اين روش جذب نمونه‌ها درطول موج‌هاي280 و260 نانومتر توسط اسپكتروفتومتر (شيماتزو، ژاپن) اندازه‌گيري و غلظت پروتئين طبق فرمول زير محاسبه شد.

(1/55×جذب در280 نانومتر) - (0/76×جذب در260 نانومتر) =(mg/ml) غلظت پروتئين

غلظتIgY خالص نيز به روش uv طبق فرمول زير محاسبه گرديد.

ضريب خاموشيIgY/ جذب در280 نانومتر =(mg/ml) غلظت پروتئين

ضريب خاموشي IgY خالص $\varepsilon = 1.4 \frac{cm^{-1}mg^{-1}}{ml}$ در نظر گرفته شد (22).

الكتروفورز در ژل پلي‌آكريل آميد در حضور سديم دودسيل سولفات

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

SDS-PAGE غيراحيايي بر اساس روش لاملي (23) در ژل جداکننده 10 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد و SDS-PAGE احيايي در ژل جداکننده 13/5 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد انجام گرفت. چهار حجم نمونه به يک حجم بافر نمونه (5x) افزوده شد و پنج دقيقه درآب جوش قرار گرفت. 10 ميکروليتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و در ولتاژ ثابت 150 ولت الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسي آبي R-350 (فارماسيا) رنگ‌آميزي شد. در موارد لازم، تراکم و درصد باندهاي پروتئين در ژل با دستگاه تراکم‌سنج (هلنا) تعيين گرديد.

اندازه‌گيري فعاليت IgY با آزمون الايزا

فعاليت آنتي‌بادي ضد IgG با روش الايزا اندازه‌گيري شد. براي اينکار، به هر چاهک ميکروپليت (نانک) 100 ميکروليتر از محلول IgG انساني با غلظت 10 ميکروگرم درميلي‌ليتر در PBS اضافه گرديد. ميکروپليت‌ها به مدت 2 ساعت در دماي 37 درجه سانتيگراد نگهداري شد. بعد از زمان فوق، محتواي چاهک‌ها تخليه و 250 ميکروليتر PBS حاوي توين بيست 0/5 درصد اضافه شد و پليت‌ها 15 دقيقه در دماي اتاق قرار داده شد. پليت‌ها سه بار با محلول PBS حاوي توين بيست 0/05 درصد (PBS-T) شسته شد. 100 ميکروليتر از نمونه‌هاي رقيق‌شده با PBS-T به حالت دوبله به چاهک‌ها اضافه گرديد و به مدت يک ساعت در دماي اتاق نگهداري شد. پليت‌ها پنج بار با PBS-T شسته شد. در مرحله بعد 100 ميکروليتر آنتي‌بادي خرگوشي ضد IgY (گونژوگه با آنزيم پراکسيداز از شرکت سيگما) که 40000 بار با PBS-T رقيق شده بود، به چاهک‌ها اضافه گرديد و به مدت يک ساعت در دماي اتاق نگهداري شد. پليت‌ها پنج بار با محلول PBS-T شسته شد و در نهايت 100 ميکروليتر از سوبستراي ترا متيل بنزيدين و آب اکسيژنه (داکو) به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش پس از 15 دقيقه با افزودن 50 ميکروليتر اسيد سولفوريک پنج درصد متوقف گرديد و جذب چاهک‌ها در 450 نانومتر توسط الايزا ريدر (Bio-TEK instruments) خوانده شد.

ايزوالکتروفوکوسينگ

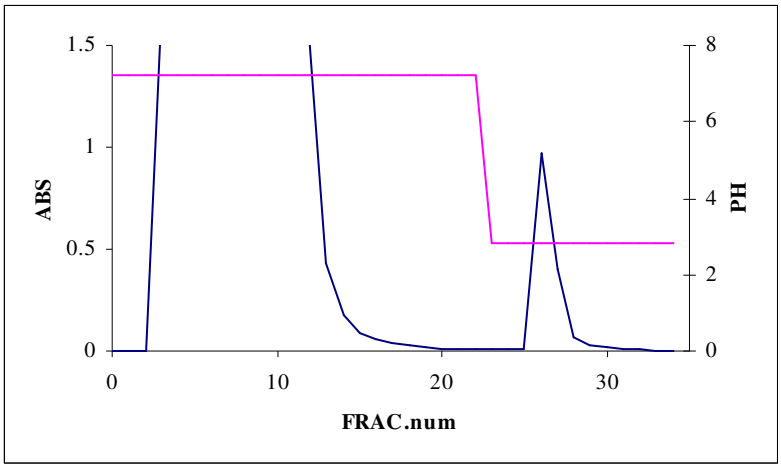
ايزوالکتريک فوکوسينگ به روش آبگيري مجدد در محدوده 8-pH 4 انجام گرفت (24، 25). براي اين کار، ژل پلي‌آکريل آميد در غلظت 4/2 درصد در عدم حضور آمفوليت‌ها و مواد حل‌کننده پروتئين بر روي طلق‌هاي قابل اتصال به ژل (GelBond PAG film) تهيه شد و پس از شستشو و خشک‌کردن، در حضور اوره 9 مولار، CHAPS دو درصد، آمفوليت 6 درصد (v/v) (به نسبت مساوي از آمفولين 5/6-4 و 8-5) و DTT 20 ميلي‌مولار مجدداً متورم گرديد. نمونه‌ها در بافر حل‌کننده حاوي اوره 9 مولار، CHAPS 4 درصد، آمفوليت 2 درصد (به نسبت مساوي از آمفولين 5/6-4 و 8-5) و DTT 80 ميلي‌مولار حل شد. نمونه‌گذاري با کاغذهاي نمونه‌گذاري در نزديکي کاتد انجام گرفت. قبل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

از نمونه‌گذاري، ژل براي مدت 20 دقيقه در ولتاژ 700 ولت الكتروفورز گرديد. پس از نمونه‌گذاري، الكتروفورز در سه مرحله صورت گرفت. ابتدا مرحله نفوذپذيري به مدت 60 دقيقه در شيب ولتاژ 500 - 0/0 ولت صورت گرفت. سپس كاغذهاي نمونه‌گذاري برداشته شد و ژل به مدت 4 ساعت در ولتاژ2500 ولت (مرحله جداسازي) و سپس 20 دقيقه در ولتاژ 3000 ولت (نازك شدن باندها) الكتروفورز گرديد. پس از اتمام الكتروفورز، ژل با كوماسي250-G رنگ‌آميزي شد (23).

يافته‌ها

با توجه به غلظت تام پروتئين و مقدار نسبي IgY در عصاره اسيدي زرده، معلوم گرديد كه IgY 17-15 درصد محتواي پروتئيني اين عصاره را تشكيل مي‌دهد. بعد از كروماتوگرافي جذبي كه نتيجه آن در شكل 1 آمده است، 5-4 درصد بخش IgY موجود در عصاره به ستون چسبيد. اين كروماتوگرام حاوي دو قله پروتئيني عمده بود. قله اول كه همراه بافر شوينده از ستون خارج گرديد، مربوط به پروتئينهاي عصاره زرده غير از آنتي‌بادي ضد IgG انسان است. قله دوم كه بعد از تغيير pH توسط گليسين از ستون خارج گرديد، مربوط به IgY ضد IgG انسان است كه 5-4 درصد محتواي IgY و حدود 0/5 درصد محتواي پروتئيني زرده را تشكيل مي‌دهد.



شكل1: كروماتوگرافي جذبي عصاره زرده در ستون سفاروز4بي حاوي ليگاند IgG انسان

الكتروفورز مربوط به دو قله حاصل از كروماتوگرافي جذبي در اشكال 3 و2 آمده است. شكل 2 الكتروفورز غيراحيايي محتواي اين دو قله در مقايسه با فراكسيون PEG را نشان مي‌دهد.

ستون 1 در اين شكل مربوط به پروتئين‌هاي ترسيب نموده توسط PEG است كه حاوي چندين باند پروتئين پرمقدار و

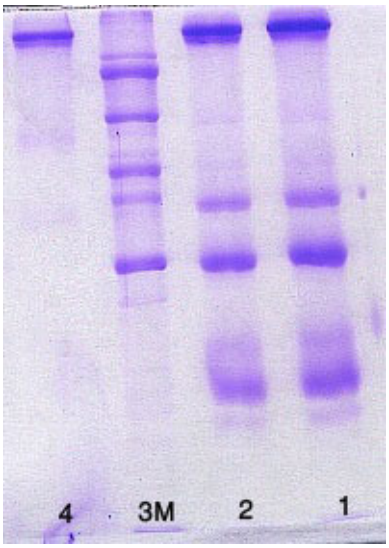
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

انواعي از پروتئين‌هاي كم مقدار است.

ستون 2 مربوط به قله اول و شامل تقريباً تمام پروتئين‌هاي ترسيب شده توسط PEG مي‌باشد و الگوي آن شباهت زيادي با ستون 1 دارد.

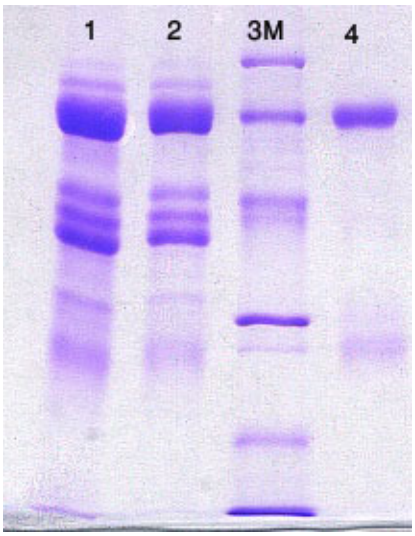
ستون 3 مربوط به بخش جذب‌شده به ستون جذبي است كه به صورت يك باند در موقعيت وزني 190 كيلودالتون در مقايسه با ماركرهاي وزن مولكولي بالا (فارماسيا) ديده مي‌شود.

نتايج تراكم‌سنجي نشان داد كه خلوص اين پروتئين از 16/4 درصد در فراكسيون PEG (ستون 1) به نزديك 99 درصد در كروماتوگرافي جذبي رسيده است (ستون 4) و ناخالصي آن نامحسوس است.



شكل2: SDS-PAGEغيراحيايي پروتئين‌هاي فراكسون PEG (ستون1)، قله اول (ستون2) و قله دوم (ستون3) كروماتوگرافي جذبي. ستون M از پايين به بالا شامل ماركرهاي وزني با اوزان 53، 76، 116، 170، 212 كيلو دالتون است.

در شكل 3 الكتروفورز احيايي نمونه‌ها آمده است. ستون 3 اين شكل مربوط به محتواي قله دوم كروماتوگرافي جذبي است كه به صورت دو باند مشخص ديده مي‌شود. اين دو باند كه مربوط به زنجيره‌هاي سبك و سنگين IgY است، در مقايسه با ماركرهاي وزني پايين (فارماسيا) به ترتيب در موقعيت 67 و 27 كيلودالتون قرار دارند. اين نوع الكتروفورز نيز خلوص محصول بدست‌آمده را به وضوح نشان مي‌دهد.



شكل3: SDS-PAGE احيايي پروتئين‌هاي فراكسون PEG (ستون1)، قله اول (ستون2) و قله دوم (ستون3) كروماتوگرافي جذبي. ستون M از پايين به بالا شامل ماركرهاي وزني با اوزان14/4، 20، 30، 45، 67، 97 است.

بررسي راندمان فعاليت محصول IgY با روش الايزا نشان داد كه محصول بدست آمده بيش از 75 فعاليت تام آنتي‌بادي دارا مي‌باشد.

الگوي IEF پروتئين‌هاي عصاره در مقايسه با IgY بدست آمده به روش‌هاي كروماتوگرافي جذبي در شرايط واسرشته‌كننده در دامنه pH 4-8 آمده در شكل 4 آمده است. در اين شرايط زنجيره سنگين و سبك IgY به صورت

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

دو منطقه منتشره، به‌ترتيب در محدوده pH 4/8-5/1 و 5/4-5/2 pH ديده مي‌شوند. با توجه به پلي‌كلونال بودن آنتي‌بادي، بخش عمده اين دو زنجيره به صورت دو باند مشخص، به ترتيب در pH 5 و pH 5/25 قرار دارد كه بيانگر نقاط ايزوالكتريك آنها در شرايط آزمايش است.

شكل4: ايزوالكتريك فوكوسينگ پروتئين‌هاي فراكسيون PEG (ستون بالا)، محصول كروماتوگرافي جذبي (ستون پايين) و ماركرهاي محدوده باز (فارماسيا) (ستون وسط).

بحث

IgY عمده‌ترين كلاس آنتي‌بادي در سرم پرندگان است كه تفاوت ساختماني و عملكردي زيادي با IgG پستانداران دارد (10-4). فراواني اين آنتي‌بادي در زرده، عدم نياز به روشهاي تهاجمي مانند خونگيري و

امكان توليد آن بر عليه انواعي از آنتي‌ژنها باعث شده تا به عنوان منبع مهم و قابل توجهي براي توليد آنتي‌بادي مطرح شود (13-9).

در مطالعه حاضر با تركيبي از دو روش آب مقطر اسيدي و ترسيب با PEG پروتئين‌هاي زرده به نحو مناسبي محلول و از مواد ليپيدي زرده جدا گرديد. آكيتا و ناكايي نشان داده‌اند كه رقيق‌سازي با آب مقطر اسيدي روشي ساده و كارآمد براي استخراج پروتئين‌هاي آب‌دوست از جمله IgY از زرده تخم مرغ است (17). با افزودن روش ترسيب با PEG در اين مطالعه كه بر اساس روش پولسن انجام گرفت (20)، بخش حاوي IgY به شكل مطلوبي رسوب كرد و ادامه كار را ساده‌تر نمود. از جمله مزيتهاي استفاده از PEG براي رسوب‌دهي پروتئين‌ها امكان كاربرد اين ماده رسوب‌دهنده در دماهاي بالاتر از صفر درجه سانتيگراد، بدون احتمال واسرشته‌شدن پروتئين‌ها مي‌باشد (26، 27). بعلاوه در روش ترسيب با PEG بر خلاف ترسيب توسط نمك، رسوب حاصله نيازي به ديالیز ندارد و ادامه تخليص با انواع كروماتوگرافي سازگار است. لازم به توضيح است كه استخراج IgY تنها براساس روش پولسن، راندمان مطلوبي ندارد و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

باعث هدر رفتن بخش قابل توجهي از آن مي‌شود (17).

پس از كروماتوگرافي جذبي كه به عنوان مرحله نهايي تخليص استفاده شد، محصول IgY اختصاصي با درجه خلوص بسيار بالا (نزديك به 99 درصد) و راندمان بيش از 75 درصد بدست آمد. بعلاوه، نتايج اين مطالعه نشان داد كه وزن مولكول كامل IgY حدود 190 و وزن زنجيره‌هاي سبك و سنگين آن به ترتيب 27 و 67 كيلودالتون است. در مقايسه با اين نتايج، وردوليوا و همكاران كه از روش كروماتوگرافي جذبي با استفاده از ليگاند سنتزي (TG19318) براي خالص‌سازي IgY استفاده نمودند، توانستند محصولي با خلوص و راندمان به ترتيب 90 و 98/5 درصد بدست آورند (1). در مطالعه ديگري كه توسط كوك و همكاران (11) با استفاده از روش كروماتوگرافي جذبي بعد از ترسيب توسط سولفات آمونيوم انجام گرفت، ميزان راندمان آنتي‌بادي حاصله 81 درصد گزارش شد، ولي درجه خلوص گزارش نشد. بعلاوه اين محققين نشان دادند كه IgY اختصاصي بدست‌آمده نزديك به يك درصد محتواي IgY زرده بوده است. اگرچه راندمان IgY در مطالعه حاضر از مطالعات كوك و وردوليوا كمتر بوده، ولي خلوص اين محصول به ميزان قابل توجهي بالاتر از مطالعات مشابه بوده است. بعلاوه نتايج اين مطالعه حاكي از آن است 5-4 درصد محتواي IgY زرده را IgY اختصاصي تشكيل مي‌دهد. اين موضوع احتمالاً ناشي از شرايط مطلوبتر ايمن‌سازي مرغ‌ها بوده است.

در مطالعه فيچتال و همكاران (18) كه از كروماتوگرافي تعويض كاتيوني براي خالص‌سازي IgY استفاده شد، ميزان خلوص 69-60 درصد و راندمان 60-65 درصد گزارش گرديد. در مطالعه ديگر، هاتا و همكاران (19) از كروماتوگرافي تعويض آنيوني دي‌اتيل آمينواتيل سفاسل بعد از ترسيب توسط سولفات سديم را براي تخليص IgY استفاده كردند. نتيجه مطالعه آنها نشان داد كه IgY با درجه خلوص و راندمان، به ترتيب 98 و 73 درصد بدست آمده است. كروماتوگرافي تيوفيليك (T-gel) روش ديگري براي خالص‌سازي IgY است كه هانسن و همكاران (4) از آن استفاده كردند. لازم به توضيح است كه روشهاي كروماتوگرافي تعويض يون و تيوفيليك اگرچه براي تخليص IgY تام مفيد هستند ولي براي تخليص IgY اختصاصي قابل استفاده نيستند.

نتايج اين مطالعه نشان داد، روش بكار رفته براي تخليص IgY اختصاصي، روشي ساده، با خلوص بالا و با راندمان نسبتاً مناسب است و براي تخليص IgY اختصاصي عليه ساير آنتي‌ژن‌ها در مقياس كم يا زياد عملي است. بعلاوه مشخص گرديد كه با ايمن‌سازي مناسب مرغ‌ها مي‌توان سهم IgY اختصاصي نسبت به IgY تام را تا حد امكان افزايش داد. چنين نتايجي در كنار مزيت‌هاي IgY باعث مي‌شود تا بتوان از آن به عنوان منبع مناسب و

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

وافري از آنتي‌بادي با اهداف مختلف استفاده نمود. براي مثال IgY بدست آمده در مطالعه حاضر كه عليه IgG انساني است به اشكال مختلف در تشخيص طبي قابل استفاده مي‌باشد.

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 Phsiol. 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]

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 bacteriophge T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
24. مصطفايي علي. راهنماي نظري و عملي الكتروفورز پروتئين در ژل، چاپ دوم. انتشارات يادآوران. 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.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-09-25]