نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 161-154

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 154-161

تولید و تخلیص ایمونوگلوبین علیه اشرشیاکلای در زرده تخم‌مرغ

محمدرضا نصیری[1]*- علیرضا حق‌پرست[2] - محمد محسن زاده[3] - احمد حسن آبادی[4] - خدیجه نصیری[5] - زهرا رودباری[6] – محمد دوستی[7]

تاریخ دریافت: 1393/4/9
تاریخ پذیرش: 1394/2/19

چکیده

تخم‌مرغ به عنوان یک منبع آنتی‌بادی جایگزین برای پستانداران می‌باشد. ایمونوگلوبین زرده تخم‌مرغ از مرغ به تخم مرغ انتقال می‌یابد و در زرده در مقادیر زیاد تجمع می‌یابد. ایمونوگلوبینYبه عنوان کاندیدایی برای جایگزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح است. هدف از این تحقیق تولید و تخلیص ایمونوگلوبین علیه اشرشیاکلای در زرده تخم‌مرغ و بررسی حضور آنتی‌بادی ضد ایکلای در زرده با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات- ژل الکتروفورز پلی‌اکریل آمیدمی‌باشد. مرغ‌های تخم‌گذار در سه دوره ایمنی زایی با آنتی‌ژن کامل اشرشیاکلی که توسط فرمالین کشته و همراه با ادجونت کامل فروند در نوبت اول و دوم و با ادجونت ناقص فروند در نوبت سوم ایمن شدند. تخم‌مرغ‌ها جهت تخلیص جمع‌آوری و تخلیص IgY براساس روش پولسون و با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول 6000 انجام شد. در نهایت با انجام الکتروفورز حضور این آنتی‌بادی را نشان دادیم. IgY از زرده تخم‌مرغ با موفقیت خالص‌سازی گردید. نتایج SDS-PAGE حضور باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلودالتونی که موید حضور زنجیره‌های سبک و سنگین IgY است را نشان دادند. اثرات IgY بر موش‌ها نشان دادند، موش‌هایی که IgY را 72ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند در برابر باکتری مصون ماندند و همچنین هنگامی که IgY با باکتری به مدت 24 ساعت انکوبه شده و به موش‌ها تزریق شدند، موش‌ها در برابر باکتری مقاوم ماندند. نتایج نشان دادند زرده تخم مرغ از مرغ‌های تخم‌گذار ایمن شده می‌تواند به عنوان منبع ایجاد ایمنی غیرفعال مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اشرشیاکلیO157:H7، آنتی‌بادی، ایمونوگلوبینY، مرغ تخم‌گذار لگهورن.

مقدمه

تخم مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی بادی ها از جمله ایمونوگلوبین Y در زرده می‌باشد. امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی بادی های زرده تخم مرغ به منظور کاربردهای تشخیص و درمانی در حال توسعه می باشد. آنتی بادی زرده تخم مرغ (IgY) ایمونوگلوبین غالب زرده تخم مرغ می‌باشد (8)و همتای IgG در پستانداران می‌باشد که امروزه کاربردهای گسترده ای پیدا کرده است. ایمونوگلوبین Y زرده تخم مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می شود و استخراج این آنتی‌بادی ها از زرده تخم مرغ در مقایسه با سایر آنتی‌بادی ها ارزان تر و آسان‌تر می باشد (7). خواص ضد باکتریایی IgY یکی از مهمترین جنبه های مطالعه IgY است. بسیاری از گزارش‌ها نشان می‌دهد که IgY می‌تواند دارای عملکرد ایمنی زایی در عفونت های باکتریایی و ویروسی در موجودات زنده باشد (15). استفاده خوراکی IgY اختصاصی علیه پاتوژن‌های بدن میزبان می‌تواند سبب محافظت در برابر همان دسته پاتوژن‌ها را بوجود آورد. افزایش روزمره باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک تحقیقات را به سمتی سوق می‌دهد که بتوان ماده‌ای در تعامل با آنتی‌بیوتیک در کنترل جمعیت های میکروبی بوجود آورد. ایمونوتراپی را می‌توان به عنوان یک درمان جانبی در برابر پاتوژن‌هایی که به راحتی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها قابل درمان نمی‌باشند، توصیه کرد. تخم‌مرغ به عنوان یک ماده غذایی است که هیچ ریسک مسمومیت و عوارض جانبی در مصرف خوراکی بروز نمی‌کند (9). IgY عمده‌ترین کلاس آنتی‌بادی در سرم پرندگان است

1- استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد،
2 - دانشیار گروه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
3- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
-4 استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد،
5، 6 و 7 - دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام (ژنتیک مولکولی) دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: (Email: nassiryr@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

و از نظر عملکرد دارای تفاوت‌های قابل توجهی با ایمونوگلوبولین سرم پستانداران از جمله IgG می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بادی تولید شده در مرغ جهت شناسایی و مصارف درمانی گزارش شده است این آنتی‌بادی‌ها (IgY) به صورت خوراکی قابل استفاده بوده و در مقایسه با IgG می‌توان حجم زیادی از آنتی‌بادی را تولید کرد (10).

سویه‌های ایکلای سروتایپ O157:H7 به رده‌ای از سویه های ایکلای انتروهموراژیک تعلق دارد که مسبب اسهال خونی و غیرخونی، کولیت‌های هموراژیک[1] و سندروم اورمی همولیتیک[2] و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک[3] می‌شوند و تولید توکسینی شبیه شیگاتوکسین می‌کند (1). گاوهای شیری به عنوان منبع اولیه از باکتری *E. coli* O157:H7 مورد ملاحظه می‌باشند و اغلب باکتری را در مدفوع خود دفع می‌کنند. این باکتری که مسبب بیماری می‌شود در ارتباط با مصرف آلوده گوشت گاو می‌باشد. ایکلای انتروهمراژیک در دفعات کم از گاوهای شیری، گوساله ها، و جوجه ها نیز جداسازی گردید. اما، در بعضی موارد، درصد بالایی از احشام دامداری، *ا.کولای*سروتایپ O157:H7 را پخش می کنند که بعضی از آنها مقاوم هستند. به طور قابل توجهی، گوساله ها پس از از شیرگرفتن در دفعات بیشتری نسبت به قبل از از شیرگرفتن، ارگانیسم را پخش می‌کنند (1).

IgY برای درمان عفونت *E.coli* در انسان پیشنهاد شده است. IgY در مقابل پروتئین‌هایی از *E. coli O157:H7* که مرتبط با چسبندگی می‌باشند، چسبندگی باکتریایی را در شرایط آزمایشگاهی در سلول‌های کشت شده کاهش داده است(5). پیشنهاد شده است که IgY ممکن به طور بالقوه کلونیزاسیون *E. Coli O157:H7* در میزبان‌هایی مثل گاو و انسان را کاهش دهد (16).

IgY ترکیبی از دو شاخه سنگین (H) و دو شاخه سبک (L) می‌باشد و توسط پل‌های دی سولفات این دو شاخه پیوند یافته اند و دارای وزن مولکولی180 کیلو دالتون بزرگتر از IgG در پستانداران می‌باشند (17). شاخه سبک شامل یک دومین متغیر (V_L) و یک دومین ثابت (C_L) است. شاخه سنگینIgY شامل یک دومین متغیر و چهار دومین ثابت (C_H1 ، C_H2، C_H3، C_H4) است که درهم سنجی با IgG که دارای سه دومین ثابت است و IgY فاقد منطقه hing قابل انعطاف نیز می‌باشد (9). هدف از این پژوهش تولید، تخلیص و ارزیابی ایمونوگلوبین زرده تخم‌مرغ (IgY) علیه *ای.کولای* در مرغ های تخم‌گذار است.

مواد و روش‌ها

آماده کردن آنتی‌ژن‌اشرشیاکلای برای تزریق

باکتری *E. coli O157:H7* از بیمارستان قائم مشهد دریافت شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت جهت رشد باکتری انکوبه شد. باکتری به صورت خطی روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. بعد از اینکه باکتری کشت داده شده به خوبی رشد کرد، یک پرگنه از باکتری برداشته شد و در 10 میلی لیتر محیط کشت مایع لوریا- برتانی[4] به مدت 24 ساعت کشت داده شد و در مرحله بعد جهت تهیه رقت های سریالی[5] استفاده گردید. در نهایت از غلظت$1/6\times10^9$cfu/mL باکتری اشرشیاکلی استفاده گردید. در ادامه جهت کشتن باکتری، مقدار 1200 مایکرولیتر از باکتری در محیط کشت مایع (استوک اصلی) برداشته شد و در دور 10000rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردیدو سپس سوپرناتانت بیرون ریخته شد و 1200 مایکرولیتر آب مقطر استریل بر روی پلت (رسوب) باکتری ریخته و ورتکس و سپس به مدت 5 دقیقه در دور 10000 سانتریفیوژ گردید. این عمل سه بار تکرار شد و در نهایت روی پلت باکتری مقدار 2 سی‌سی فرمالین 37 درصد ریخته و در دمای 37 درجه به مدت 36 ساعت انکوبه شد. یک کشت خطی از باکتری که تحت تیمار فرمالین بوده انجام شد تا از کشته شدن باکتری اطمینان حاصل شود. بعد از 24 ساعت محیط کشت را مورد بررسی قرار گرفت و اطمینان حاصل شد که هیچ باکتری رشد نکرده بود. بنابراین با استفاده از بافر فسفات سالین[6] هم حجم با مقدار اولیه ای که از باکتری در محیط کشت استفاده شد (1200 مایکرولیتر) چهار بار عمل شستشو با بافر فسفات سالین یک درصد در دور 10000 به مدت 5 دقیقه انجام شد. سپس پلت حاصل را در 600 سی سی بافر فسفات سالین حل گردید و در فریزر 80- نگهداری شد.

ایمن‌سازی مرغ‌های تخم‌گذار و جمع‌آوری تخم‌مرغ

سه قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید16 هفته‌ای به عنوان گروه تیمار و سه قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. ایمن سازی در سه نوبت و به فاصله دو هفته صورت پذیرفت. سن شروع ایمن سازی در گروه‌های شاهد و کنترل در 16 هفتگی بود که در اولین تزریق در گروه تیمار به هر مرغ 500 مایکرولیتر از آنتی‌ژن محلول در بافر فسفات سالین ($1/6\times10^9$cfu/mL) به همراه 500 مایکرولیتر از ادجونت کامل فروند در دو طرف عضله سینه به صورت داخل عضلانی تزریق شد و در

1- Hemorrhagic Colitis (HC)
2- Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)
3- thrombotic thrombocytopenic purpura

4- Luria–Bertani (LB)
5- Serial Dilution
6- Phosphate Buffer Saline(PBS)

Archive of SID

www.SID.ir

گروه شاهد 500 مایکرولیتر از ادجونت کامل فروند به همراه 500 مایکرولیتر بافر فسفات سالین در دو طرف عضله سینه به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. دومین دوره ایمنی‌زایی در 18 هفتگی از سن مرغ‌ها صورت گرفت و جهت تزریق دوم، 500 مایکرولیتر ادجونت کامل فروند را با 500 مایکرولیتر آنتی‌ژن محلول در بافر فسفات سالین مخلوط گردید. در مورد گروه شاهد تزریقات مشابه گروه تیماربود ولی محلول تزریق فاقد آنتی‌ژن *ای. کولای* بود و فقط حاوی بافر فسفات سالین بود.500 مایکرولیتر ادجونت کامل فروند و 500 مایکرولیتر بافر فسفات سالین مخلوط گردید و به گروه شاهد تزریق گردید. سومین دوره ایمن‌سازی در مرغ‌ها در سن 20 هفته‌ای صورت گرفت و جهت تزریق 500 مایکرولیتر ادجوانت ناقص فروند و 500 مایکرولیترآنتی‌ژن محلول در بافر فسفات سالین مخلوط گردید و به مرغ ها تزریق گردید. در مورد گروه شاهد تزریقات مشابه گروه تیماربود ولی محلول تزریق فاقد آنتی‌ژن *ای. کولای* بود و فقط حاوی بافر فسفات سالین و 500 مایکرولیتر ادجونت ناقص فروند مخلوط گردید. از آنجایی که هدف ما بررسی تولید آنتی‌بادی در تخم‌مرغ بود تخم‌مرغ‌ها در 2 هفته بعد از آخرین تزریق (24 هفتگی) روزانه جمع‌آوری شدند و برای خالص‌سازی ایمونوگلوبین Y در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با ثبت تاریخ و گروه مثبت (تیمار)و منفی(شاهد) جمع‌آوری و ذخیره گردید.

تخلیص ایمونوگلوبین Y

برای خالص سازی از روش اصلاح‌شده پولسون[1] استفاده گردید که سریع‌تر و درصد بازیابی IgY آن از بقیه روش‌ها بهتر بود (12). مراحل تخلیص به این صورت بوده که ابتدا سفیده تخم‌مرغ از زرده جدا گردیده که با این روش مقدار انبوهی از پروتئین‌های دیگر حذف می‌شود. سپس زرده را با یک پنس گرفته، در یک استوانه مدرج آنرا سوراخ کرده، غشای زرده را بیرون انداخته و حجم زرده داخل ستون یادداشت شد. زرده تخم‌مرغ‌ها باهم مخلوط گردید. دوبرابر حجم اولیه زرده به آن بافر فسفات سالین PH=7.6, 100mM به زرده افزوده و به خوبی در همزن مغناطیسی هم زده تا محلول کاملاً یکنواخت مات زرد رنگی بدست آمد. سپس 3/5% (W/V) پلی اتیلن گلیکول 6000 افزوده شد و تا ناپدید شدن پلی اتیلن گلیکول همزده شد و به مدت 20 دقیقه در دور 4500 rpm سانتریفیوژ و مایع رویی در ظرف دیگری برای جداسازی چربی نگهداری شد. حذف چربی به کمک فیلتراسیون از پنبه (این مرحله دو بار تکرار می شود) صورت گرفت. به این منظور یک تکه پنبه بهداشتی با قابلیت جذب رطوبت را در داخل یک قیف شیشه‌ای قرار داده و مایع رویی را دور ریخته و مایع بدست آمده جمع‌آوری گردید و حجم مایع فیلتر شده را سنجیده و ثبت شد.

1-Polson

در مرحله بعد غلظت پلی اتیلن گلیکول را به 12% (W/V) رسانیده شد. آنقدر محلول با همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا هیچ اثری از پلی اتیلن گلیکول در ته و اطراف ظرف باقی نماند. پس از آن‌که پلی اتیلن گلیکول به خوبی حل گردید، محلول در دور 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در 10 میلی لیتر از بافر فسفات سالینحل شد. رسوب بدست آمده مجدداً در پلی اتیلن گلیکول 12% حل گردید و پس ازسانتریفیوژدر دور 12000 به مدت 10 دقیقه محلول رویی دور ریخته شدو رسوب دو تا سه بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد ومعادل 5 میلی‌لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد و در دمای20-تا زمان استفاده نگهداری گردید.

بررسی IgY به روش SDS-PAGE

با استفاده از روش lamli الکترفورز سدیم دودسیل سولفات پلی-آکریل امید ژل الکترفورز انجام و از ژل 10 درصد استفاده شد. به منظور انجام الکترفورز، IgY تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ به مدت 10 دقیقه در بافر نمونه جوشانیده شد. الکترفورز بوسیله ژل 10 درصد و در شدت جریان 100 ولت انجام و پس از اتمام الکترفورز با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد.

تلقیح داخل صفاقی برای تعیین حداقل دوز کشنده(MLD)

هدف از این آزمایش تعیین کمترین میزانی از باکتری بود که به روش داخل صفاقی قادر به از بین بردن تمام موش ها است که در نتیجه قادر به بررسی حدت باکتری می باشیم. تعداد 18موش با وزن بین 20تا 22 گرم، هر یک 0/5 میلی لیتر با رقت های زیر مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. تعداد 3 موش هم به عنوان شاهد با 0/5 میلی لیتر محلول فسفات سالین بافر تزریق شدند. همه موش ها ماده بودند. تزریق با سرنگ انسولینی 1 میلی لیتر صورت گرفت.

گروه1: 5 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت $1/6\times10^{6}+1$ موش شاهد

گروه 5:2 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت $1/6\times10^{5}+1$ موش شاهد

گروه 3: 5 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت $1/6\times10^{4}+1$ موش شاهد

بررسی اثرات IgY بر روی موش‌ها

به منظور بررسی اثر IgY موش‌ها تحت تیمارهای مختلف قرار گرفتند. در هر گروه 6 موش ماده قرار داشت. گروه 1: 72 ساعت موش‌ها با IgY انکوبه شدند(موش‌ها IgY را 72 ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند) و سپس از طریق داخل صفاقی با 0/5 میلی لیتر باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

E.coli O157:H7 مورد تزریق قرار گرفتند. گروه 2: 72 ساعت موش‌ها با IgY انکوبه شدندو سپس از طریق داخل صفاقی با 0/5 میلی لیتر آب مقطر مورد تزریق قرار گرفتند. گروه 3: 24 ساعت 0/5 میلی لیتر*E. coli O157:H7* با مقدار 0/5 میلی لیتر IgY انکوبه کرده و سپس 0/5 میلی لیتر از محلول انکوبه شده جهت تزریق موش‌ها استفاده شد. گروه4: 0/5 میلی لیتر IgY جهت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. گروه 5: 0/5 میلی لیتر باکتری *E. coli O157:H7* جهت تزریق داخل صفاقی استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از خالص‌سازی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول 6000 و الکترفورز SDS-PAGE

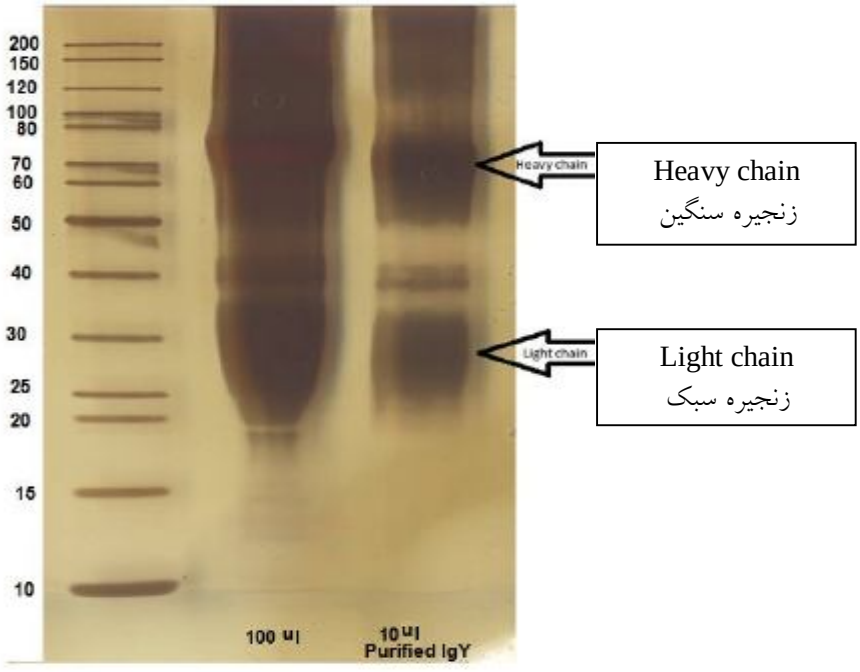
نتایج نشان دادند IgY از زرده تخم‌مرغ با موفقیت خالص‌سازی گردید و نتایج بدست آمده از SDS-PAGE حضور باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلودالتونی که مؤید حضور زنجیره‌های سبک و سنگین IgY است را نشان داد (شکل 1).

نتایج حاصل از تلقیح داخل صفاقی به موش‌ها

تزریق داخل صفاقی با سه غلظت متوالی صورت گرفت و تلفات آن تا 3 روز بررسی گردید. تلفات 12 ساعت اولیه محسوب نشد(مرگ ناشی از تزریق غلط). هیچ کدام از موش ها در طی 12 ساعت اول تلف نشده و تمامی موش های مورد تزریق در غلظت $1/6\times10^{4}$ و $1/6\times10^{5}$ سالم ماندند و تا 10 روز بعد همه ی آنها سالم بودند و هیچ تلفاتی دیده نشد. ولی تمامی موش ها در گروه 1 که با رقت $1/6\times10^{6}$ مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفته بودند در فاصله زمانی 24 تا 48 ساعت بعد مردند و فقط دو موش شاهد زنده ماند.

نتایج بررسی اثرات IgY بر روی موش‌ها

بررسی اثرات IgY بر روی درصد زنده‌مانی موش‌ها در گره اول، دوم، سوم و چهارم حاکی از زنده‌ماندن تمامی موش‌ها بوده است و هیچ تلفاتی در این گروه‌ها مشاهده نشده بود. تمامی موش‌ها در گروه 5 بلافاصله 24 تا 48 ساعت بعداز تزریق داخل صفاقی باکتری مردند. نتایج نشان دادند موش‌هایی که IgY را 72 ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند در برابر باکتری مصون ماندند. همچنین هنگامی که IgY با این باکتری به مدت 24 ساعت انکوبه شده و سپس موش‌ها به صورت داخل صفاقی تزریق شدند، موش‌ها در برابر باکتری *E. coli O157:H7* مصون ماندند.



شکل1- باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلودالتونی که موید حضور زنجیره سبک و سنگین IgY می‌باشد. لاین اول : مارکر وزن پروتینی 200 kDa ، لاین دوم و سوم : IgY تخلیص شده از زرده تخم‌مرغ.

Figure 1- 27 kDa and 67 kDa protein bands that have confirmed the presence of light chain and heavy chain of IgY. Line 1: protein marker (200kDa), line 2 and 3: purified IgY from egg yolk.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات نشان داده‌اند کـه ایمنـی‌زایـی غیرفعـال توسـط تجـویز خوراکی آنتی بادی های اختصاصی از منابع مختلف بـه عنـوان مثـال کلستروم مصون شده یا ایمونوگلوبین زرده تخم مرغ (IgY) می‌توانـد استراتژی های اقتصادی و کارایی برای مهار عفونت های روده ای در حیوانات باشد (11). تخم مرغ به عنوان مـاده مغـذی شناسـایی شـده است که شامل مقدار زیادی آنتی‌بادی ها از جمله IgY در زرده تخـم مرغ می‌باشد. زرده تخم‌مرغ شامل150- 100 میلی‌گرم IgY از حجـم کل زرده می‌باشد که 10% از آن IgY اختصاصـی اسـت(13). آنتـی-بادی‌های موجود در زرده تخم مرغ به عنوان یـک آنتـی‌بـادی ایجـاد کننده ایمنی غیر فعال، ارزان و تولید آسان تشخیص داده شده و مورد توجه قرار گرفته‌اند و مؤثر برای درمان و پیشگیری می‌باشـد (2 و 6). از مزایای استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان منبـع تولیـد آنتـی‌بـادی، کاهش موارد استفاده از حیوانات می‌باشد. به دلیل اینکه مرغ‌ها قادرند در مقایسه با حیوانات آزمایشگاهی مقادیر بالاتری از آنتی‌بـادی تولیـد کنند، می‌توانند در آینده جایگزین مناسبی برای حیوانات آزمایشـگاهی به شمار آید. مرکز اعتبار سنجی روش‌های جایگزین در اروپا اسـتفاده از آنتی‌بادی زرده را به دلیل عدم بـرهم زدن رفـاه و آسـایش حیـوان، جهت جایگزینی با آنتی‌بادی پستانداران توصیه می‌کند (13). Chae و همکاران (2006) اثرات آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ تولید شـده در پاسـخ به بخش‌های مختلف آنتی‌ژنیک E. coli O157:H7 را مورد بررسـی قرار دادند و نتایج‌ها نشان داد که سطح پاسخ ایمنی در برابـر آنتـی‌ژن کل سلولی باکتری E. coliO157:H7 بعد از شروع تزریـق بـه مقـدار بیشتری افزایش یافت و گزارش کردند کـه IgY اختصاصـی ضـد E coli O157:H7. می‌تواند از ضررهای اقتصادی مربوط به سلامتی در انسان و حیوان پیشگیری کنـد (3). همچنـین در مطالعـه Cipolla و همکاران (2001) تأثیربخشی IgY در متوقف کردن فعالیت E. coli O157:H7گزارش شده است (4). در مطالعه‌ای اثر مهارکننـدگیIgY بر روی *E. coli O157:H7* مورد بررسی قرار گرفت و نتـایج نشـان دادند که فعالیت باندشـوندگی IgY اثـر مهـاری روی رشـد *E.coli O157:H7* دارد و عملکرد آنتی‌باکتریال IgY نتیجه اثر متقابـل IgY با اجزای سطحی *E. coli O157:H7* مـی‌باشـد کـه در آزمایشـات ایمونوفلورسنس ثابت شده است (14). نتایج مطالعـه حاضـر بـا نتـایج Chae و همکـاران در سـال 2006 مطابقـت دارد. همـانطور کـه در آزمایشات مشاهده شد موش‌ها ایمن شده با IgY توانستند در برابر *E. coli O157:H7* مصون بمانند که این پدیـده را مـی‌تـوان بـه دلیـل فعالیت باندشوندگی IgY با باکتری مورد نظر دانست که باعـث مهـار باکتری می‌شود. بنابراین این مقاومت موش‌ها در برابر *ای.کلای* می-تواند به دلیل دریافت IgY توسط موش‌ها باشد، اما الزاماً به این معنی نمی‌باشد که IgY حتماً از تخم‌مرغ مرغ‌هایی باشد کـه بـا *ای. کـلای* ایمن شده‌اند چون ممکن است مرغ‌ها در محیطـی زنـدگی کننـد کـه جمعیتی از باکتری‌ها وجود داشته باشد و در برابر آن ایمن شده باشند.

نتیجه‌گیری کلی

در عرصـه کاربردهـای متنـوع آنتـی‌بـادی‌هـا، تکنولـوژی جدیـد اسـتخراج IgY از زرده تخـم مـرغ در حـال گسـترش اسـت. ایـن ایمونوگلوبولین توسط مرغ تولید شده و به درون زرده تخم مرغ بـرای ایجاد ایمنی غیر فعال برای جنین، انتقال می‌یابد که می توان با تزریق باکتری کشته شده ایکلای به عنـوان منبـع آنتـی‌ژن بـه مـرغ هـای تخمگذار و تکمیل دوره ایمنی‌زایی در مرغ به IgY اختصاصی دسـت یافت و می‌توان با توجه به بوجود آمدن سویه‌های مقاوم باکتریـایی،از این محصول در کنار یا به جای آنتی‌بیوتیک‌ها اسـتفاده کـرد و از آن به عنوان مکمل‌های درمانی استفاده کرد. ایمن سازی مرغ‌های تخم-گذار روشی عالی برای تولید مقادیر زیادی آنتی بادی می‌باشد چرا کـه تولید آنتی بادی بـا ایـن روش اسـترس زا نمـی باشـد و جداسـازی و خالص سازی IgY نسبتاً ساده می باشد و تولید بالا می باشد در ادامـه تحقیقات فنآوری IgY، بهبود پروتکل های ایمن سـازی و کمکـی و همچنین پیشرفت‌هایی در تکنیک هـای اسـتخراج و افـزایش تولیـد آنتی‌بادی، بدون شک منجر به برنامه‌های جدیدی برای ایمنو درمـانی IgY در بهبود سلامت انسان و حیوان می شود.

سپاسگزاری

پـژوهش حاضـر حاصـل طـرح تحقیقـاتی بـا شـماره 24241 از دانشکده کشاورزی دانشـگاه فردوسـی مشـهد مـی‌باشـد. از معاونـت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی که اعتبار انجام ایـن پـژوهش را تأمین نمود صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Callaway, T. R., M. A. Carr., T. S. Edrington., R. C. Anderson., and D. J. Nisbet. 2009. Diet, Escherichia coli O157:H7, and Cattle: Current Issues in Molecular Biology, 11: 67- 80.
2- Carlander, D., H. Kollberg., P. Wejaker., and A. Larsson. 2002. Peroral immunotheraphy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Journal of Immunology Research, 21 (1): 1-6.
3- Chae, H. S., N. K. Singh., C. N. Ahn., Y. M. Yoo., S. G. Jeong., J. S. Ham., and D. W. Kim. 2006. Effects of Egg Yolk Antibodies Produced in Response to Different Antigenic Fractions of *E. coli* O157:H7 on *E. coli*

Archive of SID

www.SID.ir

Suppression. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 19 (11): 1665-1670.
4- Cipolla, A., J. Cordeviola., H. Terzolo., G. Combessies., J. Bardon., R. Noseda., A. Martinez., D. Medina., C. Morsella., and R. Malena. 2001. Campylobacter fetus diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. Altex-AlternativenZuTierex-perimenten, 18 (3): 165-170.
5- Cook, S. R., P. K. Maiti., R. DeVinney., E. Allen-Vercoe., S. J. Bach., and T. A. McAllister. 2007. Avian- and mammalian derived antibodies against adherence-associated proteins inhibit host cell colonization by Escherichia coli O157:H7. Journal of Applied Microbiology, 103 (4): 1206-1219.
6- Devi, C. M., M. V. Bai., A. V. Lal., P. R. Umashankar., and L. K. Krishnan. 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 51 (2): 129–138.
7- Gassmann, M., P. Thommes., T. Weiser., and U. Hubscher. 1990. Efficient production of chicken e*gg yolk* antibodies against a conserved mammalian protein. The FASEB Journal, 4 (8): 2528-2532.
8- Goldsby, R. A., T. J. Kindt., J. Kuby., and B. A. Osbome. 2002. Kuby Immunology, 5thEdition.W. H. Freeman
9- Hatta, H., K. Tsuda., S. Akachi., M. Kim., and T. Yamamoto. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG.Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 57 (3): 450-454.
10- Kovacs-Nolan, J., and Y. Mine. 2005. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. Journal of Immunological Methods, 296(1-2):199-209.
11- Mine, Y., and J. Kovacs-Nolan. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. Journal of Medicinal Food, 5 (3): 159-169.
12- Polson, A., M. B. von Wechmar., and M. H. van Regenmortel. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol Commun, 9 (5): 475-493.
13- Schade, R., C. Staak., C. Hendriksen., M. Erhad., H. Hugl., G. Koch., A. Larsson., W. Pollmann., M. van Regenmortel., E. Rijke., H. Spielmann., H. Steinbusch., and D. Straughnan.1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. Alternatives to laboratory animals, 24: 925-934.
14- Sunwoo, H. H., E. N. Lee., K. Menninen., M. R. Suresh., and J. S. Sim. 2006. Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on Escherichia coli O157:H7. Journal of Food Science, 67 (4): 1486-1494.
15- Van Nguyen, S., K. Umeda., H. Yokoyama., Y. Tohya., and Y. Kodama. 2006. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. Canadian Journal of Veterinary Research, 70 (1): 62-64.
16- Wang, Q., X. J. Hou., K. Cai., T. Li., Y. N. Liu., W. Tu., L. Xiao., S. Bao., J. Shi., X. Gao., H. Liu., R. Tian., and H. Wang. 2010. Passive protection of purified yolk immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models. Canadian Journal of Microbiology, 56(12):1003-1010.
17- Warr, G. W., K. E. Magor., and D. A. Higgins.1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunology Today, 16 (8): 392-398.

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 154-161

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 161-154

Production and Purification Immunoglobulin against E. coli in Egg Yolk

M. R. Nassiri [1]*- A. Haghparast[2] - M. Mohsenzadeh[3] - A. Hassan Abadi[4] - K. Nasiri [5]- Z. Roudbari[6] - M. Doosti[7]

Received: 30- 06-2014
Accepted: 09-05-2015

Introduction Chicken is the only avian species in which polyclonal antibodies, like IgG is transported from the hen to the egg yolk in a similar manner as the transport of mammalian IgG from the mother to the fetus. Immunoglobulin Y in the chicken is transported to the egg and accumulates in the egg yolk in large quantities. IgY is an egg yolk antibody that has been used widely for treatment and prevention of infections in humans and animal. IgY is used for passive protection of the pathogen infections such as *Escherichia coli*, bovine and human rotavirus, bovine coronavirus, salmonella, staphylococcus and Pseudomonas. IgY is a promising candidate as an alternative to antibiotics. *Eschericha coli* strains of serotype O157: H7 belongs to a family of pathogenic *E. coli* called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains responsible for hemorrhagic colitis, bloody or non-bloody diarrhea, and hemolytic uremic syndrome in humans. This strain of *E. coli* pathogenises by adhering to host intestinal epithelium and forming bacterial colonies. The purpose of this study was to produce and purify immunoglobulin Y against *E. coli* O157:H7 and develop specific polyclonal anti *E. coli* antibody in the egg yolk.

Materials and Methods Sixteen-week-old laying hens (Mashhad, Iran) were kept in individual cages with food and water ad *libitum*. Immunization of hens was performed by intramuscularly injecting killed *E. coli O157: H7* with an equal volume of Freund's complete adjuvant into two sides of chest area (Sigma, USA) for the first immunization. Two booster immunizations followed up using complete and incomplete Freund's adjuvants in two weeks interval. Freund's adjuvant without antigen was injected to the control group. Two weeks after the last injection, the eggs were collected daily for eight weeks, marked and stored at 4 ºC. In order to IgY purification, eggs were collected. Purification of IgY from egg yolk was based on Polson and using PEG6000. Finally, the presence of antibody IgY was confirmed using SDS-PAGE. Purification of IgY was carried out by polyethylene glycol precipitation method using PEG 6000 powder (Merck, Germany) based on method of Polson. The purified IgY against E. coli was separated using 10% SDS-PAGE. In order to investigate the effect of the specific anti-E. Coli antibody, mice (Razi, Institute of Iran) were randomly distributed into five experimental groups (6mice/group). The mice were kept in conventional animal facilities and received water and food ad libitum. All animal care and procedures were in accordance with institutional policies for animal health and well-being. Experimental groups were including group 1 (mice received IgY orally in drinking water 72 hours before intraperitoneal injection of bacteria and then injected intraperitoneally with 0.5 ml of bacteria E. coli O157: H7), group 2 (mice received IgY orally in drinking water 72 hours before the injection and then injected intraperitoneally with 0.5 ml of deionized water), group 3 (0.5 ml of E. coli O157: H7 incubated with 0.5 ml of the specific anti-E. coli IgY and then 0.5 ml of the incubated solution injected to mice intraperitoneally), group 4 (mice injected with 0.5 ml of IgY) and group 5 (mice received 0.5 ml of E. coli O157: H7).

Results and Discussion We obtained specific egg yolk antibody against E. coli O157: H7 by immunizing hens with the killed E. coli O157: H7 antigen. The results showed that the IgY was successfully purified from egg yolk. SDS-PAGE analysis showed presence of protein bands 27kDa and 67 kDa of IgY, which correspond to IgY light and heavy chains. Effects of IgY on mice showed that mice received IgY orally in

1- Professor, Department of Animal Science and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,
2,3- Associate professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran,

4- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,
5, 6, 7- PhD student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
(*- Corresponding authoremail: nassiryr@um.ac.ir)

Archive of SID

www.SID.ir

drinking water 72 hours before intraperitoneal injection were protected against bacteria. Also, when specific anti-E. coli IgY was incubated with E.coli O157: H7 for 24 hours and then it was injected to mice led to mice protected against bacteria. The results of our study were agreement with the results of Chae et al (2007). We indicated mice immunized with specific anti-E. coli IgY could be protected against E. coli O157: H7. This phenomenon could be due to specific binding activity of IgY with bacteria that led to the inhibition of bacterial growth E. coli O157: H7.

Conclusion The effectiveness of IgY in suppressing the activity of E. coli O157:H7 was indicated in our study. This could be inferred from the results of the current study that IgY in the egg yolk could prevent greater economic losses due to human and animal health from pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7. These finding indicated that egg from immunized hens are potentially useful source of passive immunity.

Keywords: Antibody, *E. coli O157:H7,* Immunoglobulin Y, Laying hens.

Archive of SID

www.SID.ir