دانشور
پزشکی

تخلیص ایمونوگلوبین Y (Ig Y) با سه روش کروماتوگرافی تعویض یون، کروماتوگرافی جذبی، و رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیگول

نویسندگان: شهلا کرانی[1]، دکتر علی مصطفایی[*2] و دکتر زهیر حسن[3]

1. کارشناس ارشد بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
2. دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
3. استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسئول: Email: amostafaie@kums.ac.ir

دوماهنامه علمی - پژوهشی دانشگاه شاهد سال چهاردهم - شماره 68 اردیبهشت 1386

وصول: 84/4/16
ارسال اصلاحات: 84/1/14
دریافت اصلاحات: 85/1/26
پذیرش: 85/3/27

چکیده

مقدمه: زرده تخم مرغ، منبعی سرشار و قابل دسترس از ایمونوگلوبولین Y (IgY) است که امکان استفاده از آن برای تشخیص طبی و درمان علیه عوامل میکروبی وجود دارد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، مرغ‌ها علیه IgG خالص انسان به عنوان آنتی ژن ایمن شدند. پس از ایمن‌سازی، IgY از زرده با روش محلول‌سازی در آب مقطر اسیدی استخراج و با سه روش کروماتوگرافی تعویض یونی، کروماتوگرافی جذبی و رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیگول 6000 (PEG) تخلیص و بررسی شد. برای تخمین وزن مولکولی و اندازه‌گیری فعالیت محصول، به‌ترتیب از روش الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) و آزمون الایزا استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که راندمان و خلوص کروماتوگرافی جذبی در تخلیص IgY ضد IgG انسانی به‌ترتیب 77 و 95 درصد است. در مقابل، IgY تام با دو روش دیگر از زرده حاصل گردید. روش رسوب‌دهی با PEG که ساده‌تر، کم‌هزینه‌تر و سریع‌تر از روش کروماتوگرافی تعویض یونی است، به‌ترتیب دارای راندمان و خلوص 90 و 95 درصد بود. در روش کروماتوگرافی تعویض یونی، راندمان و خلوص IgY تام به‌ترتیب 72 و 68 درصد بود. به علاوه در این مطالعه، وزن مولکولی کامل IgY معادل 190 و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به‌ترتیب 27 و 66 کیلودالتون تخمین زده شد. IgY اختصاصی یا فراکسیون IgY حاصل را می‌توان بنا بر اهداف مختلف تشخیص طبی به کار برد.

واژه‌های کلیدی : IgY، IgG انسان، کروماتوگرافی جذبی، تخلیص، کروماتوگرافی تعویض یونی، پلی‌اتیلن گلیگول

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

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 سرم پستانداران، از جمله IgG دارد [3]. برای مثال، این آنتی‌بادی قابلیت اتصال به پروتئین Gاستریتوکوک یا پروتئین A استافیلوکوک را ندارد [4-5]، سیستم کمپلمان را فعال نمی‌سازد [6-7] و به فاکتور روماتوئیدی(RF) وصل نمی‌شود [8].

تفاوت فیلوژنی آنتی‌ژن‌های بدن پرنده با بسیاری از آنتی‌ژن‌ها، از جمله آنتی‌ژن‌های پستانداران، این امکان را می‌دهد که پاسخ هومورال مناسبی در مرغ علیه این آنتی‌ژن‌ها القا، و آنتی‌بادی با تیتر و تمایل بیش‌تری نسبت به میزبان‌های پستاندار تولید کرد [6-9]. به علاوه تولید آنتی‌بادی از زرده نسبت به تولید آنتی‌بادی در حیوانات آزمایشگاهی، محصول عمل بیش‌تری دارد [10] و نیازمند استفاده از روش‌های تهاجمی، مانند خونگیری و استرس بر حیوان و آزمایشگر نیست [11].

از سال‌ها پیش، روش‌های متفاوتی برای تخلیص و استفاده از IgY حسب اهداف تشخیص طبی و همچنین استفاده درمانی آن علیه انواعی از عوامل عفونی، بخصوص عوامل عفونی بیماری‌های روده‌ای صورت گرفته است [12-15]. روش‌های پیشنهادی برای استخراج و تخلیص IgY شامل روش‌های رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم، سولفات سدیم و پلی‌اتیلن گلیکول [16-17] و روش‌های کروماتوگرافی، شامل کروماتوگرافی هیدروفوبیک، ژل فیلتراسیون [18]، کروماتوگرافی تعویض یونی [19-20]، کروماتوگرافی جذبی [21] و کروماتوگرافی در محیط تیوفیلیک [4] بوده است. با توجه به اهمیت آنتی‌بادی ضد IgGانسان درتشخیص طبی، در این مطالعه، آنتی‌بادی ضد آن در مرغ تولید گردید و این آنتی‌بادی از زرده به سه روش متفاوت تخلیص شد. هدف از مطالعه حاضر، یافتن روش بهینه برای تخلیص IgY اختصاصی و IgY تام زرده بود.

مواد و روش‌ها

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 ادجوان کامل فروند (سیگما) اضافه و به خوبی مخلوط گردید تا امولسیون غلیظی ازآن 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 الایزا که شرح آن در بخش‌های بعدی خواهد آمد)، تخم مرغ‌ها روزانه جمع‌آوری و در دمای **4** درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

استخراج بخش غنی از IgYزرده

استخراج IgY از زرده به روش آکیتا و ناکایی انجام گرفت [10]. برای این‌کار، ابتدا زرده تخم مرغ از سفیده 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 به دست آمد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت شش ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنگاه به مدت **30** دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در **15000** × g سانتریفوژ شد. محلول رویی از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده و برای مراحل بعد نگهداری شد.

خالص‌سازیIgY

برای تخلیص IgY ازعصاره زرده از سه روش رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیگول، کروماتوگرافی تعویض یونی، و کروماتوگرافی جذبی استفاده شد. مرحله اول خالص‌سازیIgY که در سه روش تخلیص مشترک بود، شامل رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن

Archive of SID

www.SID.ir

گلیکول6000 بود. برای این‌کار، از محلول PEG 40 درصد در آب مقطر به عصاره زرده اضافه شد تا غلظت نهایی PEG به 12درصد رسید. این‌کار در دمای اتاق و روی همزن مغناطیسی انجام گرفت. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 10 درجه سانتی‌گراد درg × 10000 سانتریفوژ گردید. رسوب از مایع رویی جدا و برای مرحله نهایی تخلیص در سه روش مختلف استفاده شد. در روش رسوب‌دهی با PEG رسوب حاصل از مرحله اول در بافر فسفات 50 میلی‌مولار با 7/5 pH حل گردید. سپس به آن از محلول استوک PEG 40 درصد تا غلظت نهایی 12یا10 درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای 10 درجه سانتی‌گراد درg × 10000 سانتریفوژ و آنگاه رسوب از مایع رویی جدا و در بافر مربوط حل شد.

در روش کروماتوگرافی تعویض یونی، مرحله نهایی تخلیص IgY در ستون حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سفارز با سرعت بالا (فارماسیا) انجام گرفت. پس از به تعادل رسیدن ستون با بافرفسفات50 میلی‌مولار با 7/5 pH، رسوب حاوی IgY در غلظت 15 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در این بافر حل گردید. محلول حاصل با سرعت 15 میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون گردید. ستون با مقدار کافی بافر فسفات شسته شد تا جذب مایع خروجی آن درطول موج 280 نانومتر به کم‌تر از 0/05 رسید. پروتئین‌های چسبیده به ستون با اعمال شیب غلظت 0/3-0/0 مولار کلرید سدیم در بافر فسفات از آن جدا شدند.

در روش کروماتوگرافی جذبی، مرحله نهایی تخلیص IgY با استفاده از ستونی که واجد لیگاندIgG انسانی بود، انجام گرفت. برای این‌کار، دو گرم سفاروز 4B 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 در هر مرحله، از سانتریفوژ (g ×800 به مدت 10 دقیقه) استفاده شد. 15 میلی‌لیتر محلولIgG خالص انسانی در غلظت2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر کربنات 0/1 مولار با pH8/5 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار به ژل اضافه شد. مخلوط2 ساعت در دمای اتاق بر روی روتاتور با حرکت آرام قرارگرفت. سپس به آن 100میلی‌لیتر محلول گلیسین 2/ 0 مولار با pH8 حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار اضافه گردید و برای حداقل 2 ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. مایع رویی تخلیه شد و ژل 5 بار به طور متناوب با دو نوع بافر استات 0/1 مولار با 4 pH حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار و تریس 0/1 مولار با 8 pH حاوی کلرید سدیم 0/5 مولار شسته شد. ژل حاصل در یک ستون شیشه‌ای مناسب ریخته شد. سپس با مقدار کافی از PBS شسته شد تا به تعادل رسید. رسوب حاوی IgY در غلظت10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS حل گردید و در هر آزمون، حدود 200 میلی‌گرم از آن با سرعت 10 میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون گردید. پس از ورود نمونه، جریان PBS با سرعت 20 میلی‌لیتر در ساعت بر ستون برقرار گردید. پس از رسیدن جذب مایع خروجی به کم‌تر از 0/05 (در طول موج280 نانومتر) بافر گلیسین 0/1 مولار با pH2/8 با سرعت 10میلی‌لیتر 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 pH8 در آن‌ها ریخته شده بود، جمع‌آوری گردید.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

غلظت پروتئین عصاره و فراکسیون‌های ناخالص به روش UV اندازه‌گیری شد [22]. در این روش، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های280 و260 نانومتر اندازه‌گیری و غلظت پروتئین طبق فرمول زیر محاسبه شد:

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

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت IgY خالص به با توجه به ضریب خاموشی آن در طول موج 280 نانومتر طبق فرمول محاسبه گردید:

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

ضریب خاموشی IgY خالص $\varepsilon = 1.4 \frac{cm^{-1}mg^{-1}}{ml}$ در نظر گرفته شد [23].

الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات

SDS-PAGE غیراحیایی (در عدم حضور ماده احیاکننده) بر اساس روش لاملی [24] در ژل جداکننده 10 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد و SDS-PAGE احیایی (در حضور ماده احیاکننده) در ژل جداکننده 12/5 درصد و ژل متراکم‌کننده 4 درصد انجام گرفت. چهار حجم نمونه به یک حجم بافر نمونه (5x) افزوده شد و پنج دقیقه درمحیط 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) رنگ آمیزی شد [25]. در موارد مورد نیاز، 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 این کار، 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 شدند. 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 گرفتند. پلیت‌ها سه بار با محلول PBS حاوی توین بیست 0/05 درصد (PBS-T) شسته شدند. 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 (رقت نمونه‌ها 2000–50 بار بسته به فراکسیون IgY بود). پلیت‌ها پنج بار با PBS-T شسته شدند. 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 و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پلیت‌ها پنج بار با محلول PBS-T شسته 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) قرائت شد.

یافته‌ها

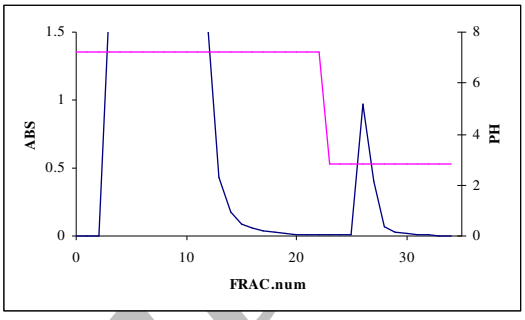
نتایج حاصل از تخلیص IgY به سه روش مختلف در شکل 2 و 3 آمده است. شکل 2 الکتروفورز غیراحیایی و شکل 3 الکتروفورز احیایی پروتئین‌ها را نشان می دهد. با توجه به غلظت تام پروتئین و مقدار نسبی IgY در عصاره اسیدی زرده، معلوم گردید که IgY 17–15 درصد از محتوای پروتئینی این عصاره را تشکیل می‌دهد. بعد از کروماتوگرافی جذبی که نتیجه آن در شکل 1 آمده 5–4 درصد بخش IgY موجود در عصاره به ستون چسبید. این کروماتوگرام، حاوی دو قله پروتئینی عمده بود. قله اول که همراه بافرشوینده از ستون خارج گردید، مربوط به پروتئین های عصاره زرده، از جمله آنتی‌بادی‌های غیر از IgY اختصاصی (ضد IgG انسان) است؛ و قله دوم که بعد از تغییر pH توسط گلیسین از ستون خارج گردید، مربوط به IgY ضد IgG انسان است که 5–4 درصد محتوای IgY و حدود 0/5 درصد محتوای پروتئینی زرده است.

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

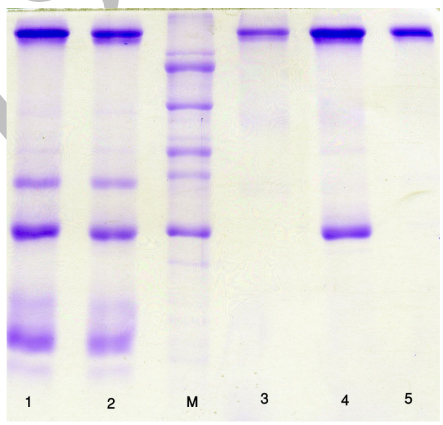
Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه با فراکسیون PEG نشان می‌دهد. ستون1 در این شکل مربوط به پروتئین‌های رسوب داده‌شده توسط PEG است که حاوی چندین باند پروتئین پرمقدار و

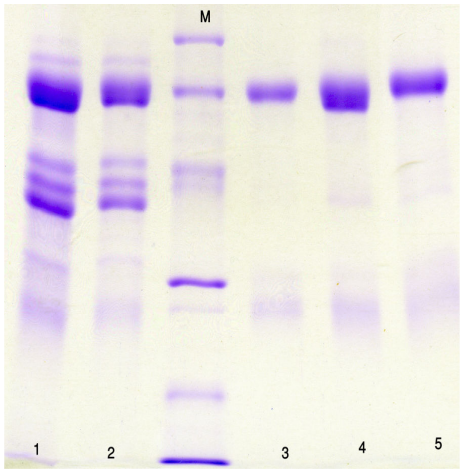


شکل 1 کروماتوگرافی جذبی عصاره زرده در ستون سفاروز 4 بی حاوی لیگاند IgG انسان



شکل 2 SDS-PAGEغیراحیایی پروتئین‌های فراکسون PEG (ستون1)، قله اول (ستون2) و قله دوم (ستون3) کروماتوگرافی جذبی، کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون4)، رسوب‌دهی دو مرحله‌ای با PEG(ستون 5). ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان 53، 76، 116، 170، 212 کیلودالتون است.

انواعی از پروتئین‌های کم‌مقدار است. ستون2 مربوط به قله اول و شامل تقریباً تمام پروتئین‌های رسوب نموده توسط PEG می‌باشد و الگوی آن شباهت زیادی با ستون 1 دارد. ستون3 مربوط به بخش جذب‌شده به ستون جذبی است که به صورت یک باند در موقعیت وزنی190 کیلودالتون 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 95 درصد در کروماتوگرافی جذبی رسیده (ستون3) و



شکل 3 SDS-PAGE احیایی پروتئین‌های فراکسیون PEG (ستون1)، قله اول (ستون2) و قله دوم (ستون3) کروماتوگرافی جذبی،کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون4)، پروتئین مرحله دوم فراکسیون PEG(ستون5). ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان4/ 14، 20، 30، 45، 66، 97 است.

ناخالصی آن نامحسوس است. محاسبات این نتایج در جدول 1 آمده است.

در شکل 3 الکتروفورز احیایی نمونه‌ها آمده است. ستون3 این شکل مربوط به محتوای قله دوم کروماتوگرافی جذبی است که به‌صورت 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 موقعیت‌های وزنی 66 و27 کیلودالتون قرار دارند. این نوع الکتروفورز نیز خلوص محصول به دست‌آمده را به‌وضوح نشان می‌دهد.

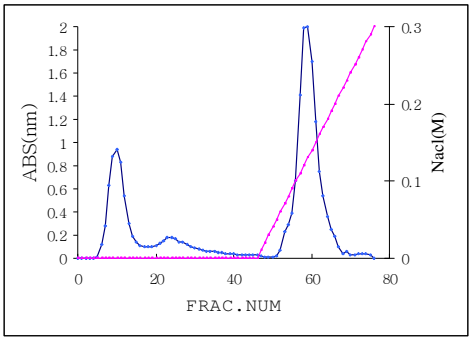
بررسی راندمان فعالیت محصول IgY حاصل از کروماتوگرافی جذبی با روش الایزا نشان داد که محصول به دست‌آمده بیش از 77 درصد فعالیت تام آنتی‌بادی را دارا است (جدول 1).

Archive of SID
www.SID.ir

در روش رسوب‌دهی با PEG، ابتدا پروتئین‌های عصاره اسیدی زرده توسط PEG در غلظت نهایی 12 درصد رسوب داده شد. رسوب حاصل از مرحله اول در بافر فسفات نمکی (PBS)حل گردید و مجدد توسط PEG در غلظت نهایی 10 یا 12 درصد رسوب داده شد. نتیجه حاصل از این روش در شکل 2 و3 آمده است. ستون1 در شکل 2 و 3 مربوط به پروتئین‌های رسوب داده شده توسط PEG و ستون 5 در هر دو شکل مربوط به مرحله دوم رسوب‌دهی با PEG است که IgY در شکل 2 در شرایط غیراحیایی به صورت تک باندی و در شکل 3 در شرایط احیایی به صورت دو باند (زنجیره سنگین و سبک) دیده می شود. در این روش، خلوص و راندمان فعالیت محصولIgY به ترتیب نزدیک به 95 و بیش از90 درصد تخمین زده شده است (جدول 1).

نتیجه حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون در شکل [4] آمده است. این کروماتوگرام، حاوی سه قله پروتئینی مشخص است. دو قله اول که همراه بافر شوینده از ستون خارج گردیدند، مربوط به پروتئین‌های عصاره زرده غیر از IgY است. قله سوم که با شیب غلظت کلرید سدیم از ستون خارج گردید، شامل IgY همراه با یک پروتئین دیگر به‌عنوان ناخالصی است که در الگوی الکتروفورزی مشهود است (ستون 4 شکل 2 و 3).

این ستون در هر دو شکل مربوط به مرحله نهایی تخلیصIgY توسط این روش است. در شکل2، IgY با پروتئین دیگری که بار الکتریکی نزدیک به آن دارد، همراه است. الگوی الکتروفورز احیایی محصول IgY (شکل3) حاکی از آن است که این ناخالصی، وزنی کم‌تر از زنجیره سنگین IgY دارد و در موقعیت پایین‌تر از این زنجیره قرار می‌گیرد. بنابراین، تفکیک این پروتئین با زنجیره سنگین IgY بخصوص در حالتی که غلظت نمونه الکتروفورز شده زیاد باشد، چندان ساده نیست. در این روش، خلوص و راندما ن محصولIgY به ترتیب نزدیک به 68 و بیش از72 درصد تخمین زده شد.



شکل 4 کروماتوگرافی تعویض یونی عصاره زرده روی ستون دی‌اتیل آمینواتیل سفاروز

بحث

IgY عمده‌ترین کلاس آنتی‌بادی در سرم پرندگان است که تفاوت ساختمانی و عملکردی زیادی با IgG پستانداران دارد [1-4]. فراوانی این آنتی‌بادی در زرده، عدم نیاز به روش‌های تهاجمی مانند خونگیری، و امکان تولید آن علیه انواعی از آنتی‌ژن‌ها باعث شده تا به عنوان منبع مهم و قابل توجهی برای تولید آنتی‌بادی مطرح شود [26].

جدول 1 خلوص و راندمان تخلیص IgY با سه روش رسوب‌دهی با پلی‌اتیلن گلیکول، کروماتوگرافی تعویض یون و کروماتوگرافی جذبی

مرحله تخلیص	پروتئین تام (میلی‌گرم)	IgY (mg)	خلوص (درصد)	فعالیت (واحد جذب)	درصد بازیافت
عصاره زرده	260	10/4	4	18128	100
بخش محلول در آب زرده	60/9	10	16/4	17402	96/1
مرحله اول رسوب دهی با پلی‌اتیلن گلیکول	20	9/75	30	16995	93/75

Archive of SID
www.SID.ir

مرحله دوم رسوب دهی با پلی‌اتیلن گلیکول	10	9/4	95	16387	90/4
کروماتوگرافی تعویض یون	11	7/48	68	13034	71/9
کروماتوگرافی جذب	8/6	8/1	95	14086	77/7

در مطالعه حاضر با ترکیبی از دو روش آب مقطر اسیدی و رسوب‌دهی با PEG پروتئین‌های زرده به نحو مناسب، محلول و از مواد لیپیدی زرده جدا گردید. آکیتا و ناکایی نشان داده‌اند که رقیق‌سازی با آب مقطر اسیدی، روشی ساده و کارامد برای استخراج پروتئین‌های آب‌دوست از جمله IgY از زرده تخم مرغ است [17]. با افزودن روش رسوب‌دهی با PEG در این مطالعه که بر اساس روش پولسن انجام گرفت [16]، بخش حاوی IgY زرده به شکل مطلوبی رسوب کرد و ادامه کار را ساده‌تر کرد. ازجمله مزیت‌های استفاده از PEG برای رسوب‌دهی پروتئین‌ها، امکان کاربرد این ماده رسوب‌دهنده در دماهای بالاتر از صفر درجه سانتی‌گراد، بدون احتمال واسرشته‌شدن پروتئین‌ها است [27]. به علاوه در روش رسوب‌دهی با PEG برخلاف رسوب‌دهی توسط نمک، رسوب حاصل نیازی به دیالیز ندارد و ادامه تخلیص با انواع کروماتوگرافی سازگار است. لازم به توضیح است که استخراج IgY تنها براساس روش پولسن، راندمان مطلوبی ندارد و باعث هدر رفتن بخش قابل توجهی از آن می‌شود [17].

در دو روش رسوب‌دهی دو مرحله‌ای با PEG و کروماتوگرافی جذبی که هر یک به عنوان مرحله نهایی تخلیص استفاده شد، محصول IgY با درجه خلوص قابل توجه (نزدیک به 95 درصد) و راندمانی به ترتیب بیش از90 و 77 درصد به دست آمد. در مقابل، در روش کروماتوگرافی تعویض یون، درجه خلوص و راندمان محصول IgY به‌ترتیب 68 و 72 درصد بود. به علاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که وزن مولکول کامل IgY حدود 190 و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به ترتیب 27 و 66 کیلودالتون است. در مقایسه با این نتایج، وردولیوا و همکاران او که از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از لیگاند سنتزی (TG19318) برای خالص‌سازی IgY استفاده کردند، توانستند محصولی با خلوص و راندمان به ترتیب 90 و 98/5 درصد به دست آورند [1]. در مطالعه دیگری که توسط کوک و همکارانش [9] با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی بعد از رسوب‌دهی توسط سولفات آمونیوم انجام گرفت، میزان راندمان آنتی‌بادی حاصل 81 درصد گزارش شد، ولی درجه خلوص آن گزارش نگردید. به علاوه این محققین نشان دادند که IgY اختصاصی به دست آمده، 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 است. علاوه بر این، نتایج این مطالعه حاکی است که 5-4 درصد محتوای IgY زرده را IgY اختصاصی تشکیل می‌دهد. این موضوع احتمالاً ناشی از شرایط مطلوب‌تر ایمن‌سازی مرغ‌ها در مطالعه حاضر بوده است.

فیچ‌تالی و همکاران او [28] در مطالعه خود از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی برای خالص‌سازی IgY استفاده کردند که میزان خلوص 69-60 درصد و راندمان 65-60 را درصد برای IgY گزارش دادند. در مطالعه دیگر، هاتا و همکارانش [29] از کروماتوگرافی تعویض آنیونی دی‌اتیل آمینواتیل سفاسل و در مرحله بعدی از رسوب‌دهی توسط سولفات سدیم برای تخلیص IgY استفاده کردند. نتیجه مطالعه آن‌ها نشان داد که IgY به دست آمده از درجه خلوص و راندمانی به ترتیب معادل 98 و73 درصد برخوردار است. کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) روش دیگری برای خالص‌سازی IgY است که هانس و همکاران او [4] از آن استفاده کردند. آکیتا و ناکایی با استفاده از روش رسوب‌دهی با PEG (سه مرحله)، محصولIgY با درجه خلوص و راندمان به‌ترتیب 86 و 91 درصد را به دست آوردند [17]. لازم به توضیح است که روش‌های

Archive of SID

www.SID.ir

کروماتوگرافی تعویض یون و تیوفیلیک و روش‌های رسوب‌دهی، اگرچه برای تخلیص IgY تام مفید هستند ولی برای تخلیص IgY اختصاصی قابل استفاده نیستند. از طرفی، کروماتوگرافی تعویض یونی به تنهایی جهت تخلیص IgY با توجه به پایین بودن میزان درجه خلوص و فعالیت محصول، روش مناسبی نیست. نتایج این مطالعه نشان داد با مقایسه روش‌های به کار رفته برای تخلیص IgY تام، روش رسوب‌دهی با PEG روشی ساده، با خلوص و راندمان بالا است و روش کروماتوگرافی جذبی، روشی مناسب برای تخلیص IgY اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌ها در مقیاس کم یا زیاد است. به علاوه مشخص گردید که با ایمن‌سازی 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 وافری از آنتی‌بادی به اهداف مختلف استفاده کرد. برای مثال IgY به دست آمده در مطالعه حاضر که علیه IgG انسانی است به اشکال مختلف در کیت‌های تشخیص طبی قابل استفاده است.

منابع

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 G.A & Clem L.W.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 A. J 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 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. 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.
10. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. J Food Sci, 1992; 57(3): 629-634.
11. 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.
12. Toshihiko K, Takahik O, Yoshihiro S, Yoshio N. Immunization against dental caries. A review. Vaccine, 2002; 20: 2027-2044.
13. Gürtler M, Fehlhaber K. Growth of Salmonella enteritidis in yolk from eggs laid by immunized hens. Int J Food Microbiol, 2004; 90: 107-113.
14. 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.
15. Ebina T, Prophylaxis of Rotavirus gastroenteritis using immunoglobulin. Arch Virol Supple, 1996; 12: 217-217.
16. 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.
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. Hassl A, Aspock H. Purification of egg yolk immunoglobulins, a two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. J Immunol Methods, 1988; 110:225-228.
19. McCannel A and Nakai S. Separation of egg yolk immunoglobulins into sub-populations using DEAE-ion exchange chromatography. Can Inst Food Sci Technol J, 1990; 23: 42-46.
20. Fichtali J, Chrter EA, Lo Ko and Nakai S. Separation of egg yolk immunoglobulins using an automated liquid chromatography system. Biotechnol Bioeng, 1992; 40: 1388-1394.
21. 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.
22. Roe S. protein purification techniques. Second edition. 2001; pp. 28-32.
23. Linden CD, Roth TF. IgG receptors on fetal chick yolk sac. J Cell Sci, 1978; 33: 317-328.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophge T4. Nature, 1970; 227: 680-685.
25. مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل، چاپ دوم. انتشارات یادآوران. 1382.
26. Zhang WW. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery – A review. Drug Discov Today, 2003; 8(8): 364-371.
27. Polson A, Potgieter GM, Largier JF, Mears GEF and Joubert FJ. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. Biochim Biophys Acta 1964; 82: 463-470.

Archive of SID

www.SID.ir

28. Fichtal J, Charter EA, Lo KV and Nakai S. Purification of antibodies from industrial separated egg yolk. J Food Sci, 1993; 58(6): 1285-1290.

29. 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.

Archive of SID

www.SID.ir