

● مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم، شماره ۳ (پیاپی ۱۱)، صفحه ۴۷ الی ۵۴، تابستان ۱۳۸۰

ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ (IgY) از ساختمان مولکولی تا کاربردهای پزشکی

دکتر مهدی پورامیر*

استادیار گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی بابل

ایمونوگلوبولین Y (IgY) بدست آمده از زرده تخم مرغ میتواند جایگزین IgG های تولید شده توسط پستانداران شود. زرده تخم مرغ مرغهای ایمونیزه شده، منبعی سرشار و ارزان از آنتی بادیهای پلی کلونال ویژه است و مرغها علیه آنتی ژنهای حفاظت شده پستانداران، پاسخ بهتری میدهند. IgY با فاکتورهای روماتوئیدی و رسپتورهای FC پستانداران و باکتریها واکنش نمی دهد و خطای مثبت را کاهش میدهد. اما مشکل اصلی در جداسازی آن، حذف مقدار زیادی لیپید است که در زرده تخم مرغ وجود دارد. روشهای متعددی برای جداسازی و تخلیص IgY از زرده تخم مرغ بکار میرود از جمله: روش رقیق سازی با آب و کروماتوگرافی IgY . T-gel. در تشخیص ایمنی و درمان قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، جداسازی، خالص سازی، تشخیص، درمان.

مقدمه

آنتی بادی‌های پلی کلونال و اجزاء آن که از سرم حیوانات ایمونیزه شده بدست می‌آید در طراحی انواع سنجش‌های ایمنی و نیز در درمان مسمومیتها و بیماریها کاربرد فراوانی دارند (۵-۱). تهیه ایمونوگلوبولینهای پلی کلونال از سرم حیوانات (خرگوش، گوسفند، بز و اسب) نیاز به خونگیری مکرر، مراحل تهیه سرم، جداسازی و تخلیص آنتی بادیها و نیز ذخیره سازی مناسب دارد. همچنین این آنتی بادیها با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش داده و در سنجش‌های ایمونوشیمیایی « خطای مثبت » ایجاد می‌کنند (۶). زرده تخم مرغ سرشار از آنتی بادیهای پلی کلونال است که این آنتی بادیها ایمونوگلوبولین Y (ایمونوگلوبولین Yolk یا IgY) نامیده میشوند (۵-۱). ایمونوگلوبولین Y در تحقیقات علوم پزشکی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها در سالهای اخیر کاربرد گسترده‌ای دارد.

در این مطالعه مروری، ساختمان و خواص IgY و نیز روشهای جداسازی و خالص سازی آن بررسی می‌شود. همچنین نتایج تحقیقات اخیر در زمینه کاربردهای تشخیصی و درمانی IgY می‌باشد.

مشخصات و خواص مولکولی IgY

مطالعات اسپکترومتری جرمی نشان می‌دهد که وزن مولکولی IgY و زنجیره‌های سنگین و سبک آن بترتیب ۱۶۷۲۵۰، ۶۵۱۰۵، ۱۸۶۶۰ دالتون می‌باشد (۷).

سایر مشخصات و خواص IgY عبارتست از :

۱. وزن مولکولی زنجیر سنگین IgY بیشتر از وزن مولکولی زنجیر سنگین IgG پستانداران است (۷).
۲. وزن مولکولی زنجیر سبک IgY کمتر از وزن مولکولی زنجیر سبک IgG پستانداران است (۷).

۳. در هضم آنزیمی IgY با پپسین، اجزا Fab تولید میشود، در حالیکه در مورد IgG پستانداران در شرایط مشابه اجزا F(ab)2 حاصل می‌شود (۷).
۴. زنجیره سنگین IgY شامل پنج دوماین (Domain) ساختمانی است و با وجود یک دوماین اضافی (نسبت به IgG پستانداران) فاقد منطقه لولایی شکل (Hinge) است (۸) (شکل ۱).

شکل ۱. ساختمان مولکولی IgG پستانداران و IgY زرده تخم مرغ

۵. IgY ایمونوگلوبولین اصلی شناسایی شده در زرده تخم مرغ است و نقطه ایزوالکتریک آن با IgG پستانداران تفاوت دارد (۹).
۶. بدلیل فاصله فیلوژنتیک (تکامل نژادی) پرندگان و پستانداران، آنتی بادی علیه پروتئینهای پستانداران در مرغها آسانتر از خرگوشها تولید می‌شود (۱۰).
۷. IgY از سرم مرغ وارد زرده تخم مرغ شده و روزانه جمع‌آوری می‌گردد. بدون استفاده از روشهای تهجمی مانند خونگیری می‌توان آنتی بادیهای موجود در زرده را جدا و در ۴ درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری نمود (۱۱).

پلی ساکاریدهای یونیون	برای حذف لیپیدها و لیپوپروتئینهای زرده تخم مرغ استفاده می شود و به عنوان یکی از روشهای مرجع گزارش شده است. دکستران سولفات و کربوکسی متیل سلولز از پلی ساکاریدهای یونیون مورد استفاده در این روش است (۲۰ و ۲۱).
پلی اتیلن گلیکول (PEG)	در مرحله اول با PEG 6000 (۳/۵٪) مواد لیپیدی رسوب کرده و در مرحله بعد PEG 6000 (۱۲٪) باعث رسوب IgY می شود. در روش دیگر ابتدا یک حجم کلروفورم به یک حجم زرده تخم مرغ افزوده شده و سپس از PEG (۱۲٪) استفاده می شود (۱۹ و ۲۲).
صمغ ها (Gums)	صمغ های طبیعی مانند Carrageenan و صمغ گرانتان باعث رسوب لیپوپروتئینهای زرده تخم مرغ می شوند (۲۳).

روشی که در این آزمایشگاه با هزینه و تجهیزات کم انجام شد، ترکیبی از روشهای رقیق کردن زرده و استفاده از حلالهای آلی بود که با کمی تغییرات نسبت به روشهای مذکور طراحی و راه اندازی شد (۱۶).

اولین مرحله خالص سازی بعد از استخراج پروتئین ها از زرده تخم مرغ، رسوبدهی انتخابی IgY با نمکهایی مانند سولفات آمونیوم و سولفات سدیم می باشد. آخرین مرحله شامل روش (هیدروفوبیک، ژل فیلتراسیون، میل ترکیبی و تیوفیلیک) است که با توجه به شرایط آزمایشگاه، یک یا چند کروماتوگرافی مورد استفاده قرار می گیرد. روشهای استاندارد خالص سازی ایمونوگلوبولین Y به شرح زیر می باشند:

۱) رسوبدهی انتخابی با سولفات آمونیوم یا سدیم

حلالیت پروتئینها در محلولهای آبی بستگی به پوشش انحلال پذیری دارد، یعنی به لایه ای از مولکولها و یونهایی که پروتئینها را محاصره کرده اند. پوشش انحلال پذیری به دلیل نیروهای الکترواستاتیک و قطبی بین قسمتهای باردار و قطبی مولکول پروتئین و دو قطبی های آب تشکیل می شود. افزودن نمکهای خنثی نظیر سولفات آمونیوم و سولفات سدیم، ضخامت پوشش انحلال پذیری یا غلظت مؤثر آب را کاهش داده، حلالیت پروتئین مورد نظر را کم می کند. در غلظتهای مشخص از نمک، پروتئین نامحلول شده و رسوب می کند. پروتئینهای

۸. IgY به کمپلمان پستانداران و رسپتورهای FC متصل نمی شود و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی دهد (۱۲).

۹. IgY با پروتئین A استافیلوکوکی و پروتئین G استرپتوکوکی واکنش نمی دهد و با رنگ «آبی درخشان کوماسی» واکنش کمی نشان می دهد (۹ و ۱۳).

۱۰. IgY در برابر گرما و اسید نسبتاً پایدار است ولی در مقایسه با IgG خروگوش، پایداری کمتری دارد (۱۴).

۱۱. مقدار آنتی بادی که از یک مرغ، تخم گذار در طی یکسال بدست می آید بیش از ۲۰ گرم است که چندین برابر آنتی بادی تولید شده توسط خروگوش در زمان مشابه است (۱۵).

۱۲. ساختمان مولکولی IgY در مقایسه با آنتی بادهای خروگوش انعطاف پذیری کمتری دارد. بنابراین در واکنشهای رسوبدهی مقدار بیشتری IgY مورد نیاز است (۸).

روشهای جداسازی و خالص سازی

مشکل اصلی در تهیه IgY، جدا کردن لیپیدها از پروتئینهای زرده است. زرده دارای حدود ۵۰٪ ماده غیرآبی است، اولین مرحله در تهیه IgY جداسازی بخش آبی که دارای IgY است، از بخش لیپیدی می باشد. پنج روش استاندارد برای جداسازی پروتئینهای زرده در جدول (۱) شرح داده شده است.

جدول ۱. روشهای جداسازی پروتئینها از لیپیدهای زرده تخم مرغ

روش	شرح روش
رقیق کردن زرده و سانتریفوژ در دور زیاد	در این روش زرده از سفیده جدا شده و بعد از شستشو با آب دیونیزه، غشاء محافظ آن پاره و زرده جمع آوری می گردد. زرده را با محلول اسیدی رقیق و بعد از سانتریفوژ در ۱۰۰۰ و در دمای ۴ درجه، پروتئینهای زرده در سوپرناتانت ظاهر شده و لیپیدهای موجود در رسوب حذف میشوند (۹ و ۱۷).
حلالهای آلی	در این روش از حلالهای آلی هیدروفوب نظیر کلروفورم استفاده شده است که بعد از انکوباسیون و سانتریفوژ لایه فوقانی که دارای پروتئین است جدا می شود (۱۸ و ۱۹).

عمل می‌کند (۳۰-۳۱). مولکولهای آنتی‌بادی متصل شده با شستشوی ویژه یا غیر ویژه رها می‌شوند. شستشوی ویژه ملایم‌تر است و غلظت زیاد لیگاند آزاد (هاپتن یا آنتی‌ژن) موجود در بافر شوینده باعث آزادسازی آنتی‌بادی و خروج آن از ستون می‌شود.

۵) کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel)

کروماتوگرافی برهمکنش تیوفیلیکی (T-gel) اولین بار توسط Porath و همکاران در سال ۱۹۸۵ بطور تصادفی کشف شد (۳۲). آنها مشاهده کردند که ژل فعال شده با دی وینیل سولفون (DVS) و متصل به ۲- مرکاپتواتانول (2ME) با پروتئینهای سرم انسان واکنش می‌دهد و عمدتاً به IgA, IgM, IgG و به مقدار کم به $\alpha 2$ - ماکروگلوبولین و ترانسفرین متصل می‌شود. این واکنشها وابسته به غلظت نمک می‌باشد.

ساختمان عمومی جاذب در T-gel را می‌توان بصورت نشان P-O-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-S-R که P ماتریکس پلیمر و R بنیان آلیفاتیک کوچک را نشان می‌دهد. برای تأکید بر اهمیت سولفات و انتهای سولفور تیواتر، این نوع بر همکنش (تیوفیلیک) نامیده شده است (۳۳-۳۴).

مکانیزم اتصال پروتئینها در T-gel بخوبی شناخته نشده است ولی مکانیزم احتمالی شامل تشکیل کمپلکس الکترون دهنده - الکترون پذیرنده بین نواحی با فقر و غنای الکترونی مجاور هم واقع در حفره هیدروفوبی روی پروتئین از یکسو و تیواتر (دهنده الکترون) و سولفون (پذیرنده الکترون) مربوط به لیگاند از سوی دیگر است. در سالهای اخیر به دلیل مزایای آنتی بادی ویژه تخم مرغ (IgY) و نیز مشکلات استفاده از روشهای رایج در تخلیص IgG، محققین برای تخلیص IgY از T-gel استفاده می‌کنند.

کاربرد IgY در تحقیقات علوم پزشکی

در سنجشهای ایمنی (Immunoassays) که با استفاده از آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و نشانهای نظیر رادیواکتیو، آنزیم

مختلف موجود در محلول آبی در غلظتهای نمکی متفاوت رسوب می‌کنند (۲۴) و از این پدیده برای جدا کردن آنها استفاده می‌شود. با این روش ایمونوگلوبولین نسبتاً خالص را میتوان از سرم پستانداران، مرغ و زرده تخم مرغ جدا کرد ولی پروتئینهای مزاحم کاملاً حذف نمی‌شود (۲۵).

۲) کروماتوگرافی هیدروفوبیک

در این نوع کروماتوگرافی، گروههای هیدروفوب مولکولهای جدا شونده با گروههای هیدروفوب مستقر در ستون کروماتوگرافی واکنش می‌دهند. این برهمکنش تحت تاثیر قدرت یونی، نوع یونها، درجه حرارت و pH قرار دارد. برهمکنشهای هیدروفوبیکی نسبتاً ضعیف است و پروتئین به شکل طبیعی باقی می‌ماند. این نوع کروماتوگرافی به همراه کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای خالص سازی IgY استفاده شده است (۲۶).

۳) کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

در ژل فیلتراسیون، محلول دارای پروتئین (فاز متحرک) در ستونی دارای ذرات کوچک با منافذی دقیقاً کنترل شده (فاز ساکن) قرار میگیرد. حرکت ماده حل شده بستگی به جریان فاز متحرک و حرکت براونی این مولکولها دارد که باعث نفوذ آنها به داخل و خارج ذرات ژل می‌شود. در این روش از ژلهای منفذدار استفاده می‌شود و ترکیبات براساس اندازه و شکل مولکولی جدا می‌گردند. انواع مولکولها بر اساس وزن مولکولی در مایع خروجی ظاهر شده و مولکولهای با وزن مولکولی بیشتر، زودتر خارج می‌شوند (۲۷-۲۹).

۴) کروماتوگرافی آفینیتی (میل ترکیبی)

کروماتوگرافی میل ترکیبی روش ویژه‌ای که برای تهیه ایمونوگلوبولینها بکار می‌رود، بر اساس جفت ترکیباتی است که ویژه هم هستند. به عنوان مثال زوج آنتی‌ژن (یاهپتن) و آنتی‌بادی را می‌توان ذکر کرد که این موارد از نوع کروماتوگرافی ایمونوآفینیتی است. یک آنتی‌ژن به عنوان لیگاند برای جداسازی آنتی‌بادی ویژه (مانند IgY آنتی ترانسفرین)

۳) ایمونوترابی برای پیشگیری و درمان عفونتهای رودهای

تجویز خوراکی آنتی بادیهای ویژه شیوه جالبی برای ایمنی حفاظتی در برابر پاتوژنهای دستگاه گوارش در انسانها و حیوانات است. با وجود افزایش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیکها و نیز مشکلات درمان تعدادی از عوامل بیماریزا با آنتی بیوتیکهای موجود، ارزش ایمونوترابی با آنتی بادیهای خوراکی نظیر IgY مشخص می شود. IgY سیستم کمپلمان پستانداران را فعال نمی کند و با رسپتورهای FC واکنش نمی دهد، بنابراین با تجویز آن پاسخ التهابی در دستگاه گوارش رخ نمیدهد. همچنین تخم مرغها جزء غذاهای طبیعی هستند لذا از نظر عملی خطر اثرات جانبی و مسمومیت وجود ندارد (۳۹). مطالعات نشان می دهد که IgY های ویژه مانع عفونتهای باکتریایی و ویروسی می شوند (۴۰).

تحقیقات نشان می دهد که IgY محصور شده در داخل لیپوزوم در شرایط اسیدی و نیز در برابر تخریب آنزیمی (پسین) تا حد زیادی فعال باقی می ماند (۴۱).

۴) ایمونیزاسیون غیرفعال (Passive) برای پیشگیری و درمان پوسیدگی دندان

حفره دهانی انسان محل اقامت باکتریهای زیادی است. تعدادی از بیماریهای دهان و دندان به دلیل کلونیزاسیون باکتریها، خصوصاً استرپتوکوک موتان می باشد. مطالعات نشان می دهد که استرپتوکوک موتان علت اصلی پوسیدگی دندان است. ایمونوگلوبولین Y تولید شده علیه استرپتوکوک موتان، چسبندگی این باکتریها به دیسکهای هیدروکسی آپاتیت آغشته به بزاق را کاهش می دهد (۴۲). همچنین IgY علیه GBP-B (glucan binding protein B) استرپتوکوک موتان اثر حفاظتی در برابر پوسیدگی دندان و عفونت های ناشی از استرپتوکوک موتان دارد (۴۳).

۵) تولید IgY علیه سم مار: IgY تولید شده علیه سم نوعی مار (Brazilian snake) باعث شناسایی و خنثی کردن اجزاء سمی و کشنده آن شد. این آنتی بادی فعالیت

و ماده فلورسنت انجام می شود، IgY به عنوان مولکولی واسط و یا به عنوان آنتی بادی نشاندار مورد استفاده قرار می گیرد. در این موارد آنزیمهایی نظیر HRP (horseradish peroxidase) و مولکولهایی مانند FITC (Fluorescein isothiocyanate) به IgY متصل می شود (۳۶-۳۵).

IgY تولید شده علیه هورمونها، سموم، میکروارگانیزمها و پروتئینهای فعال بویژه پروتئینهایی که در پستانداران آنتی بادیهای مؤثری علیه آنها تولید نمی شود، کاربردهای تشخیصی و درمانی مؤثری دارد که مواردی از آن عبارتند از :

۱) طراحی روش immunosorbent ELISA (Enzyme linked assay) برای اندازه گیری YKL-40

ELISA رقابتی غیرمستقیم برای اندازه گیری YKL-40 (gp-39 غضروفی) در سرم خوکچه هندی، با استفاده از آنتی بادیهای زرده تخم مرغ (IgY) طراحی شده است. وجود آنتی بادیهای ویژه یکماه بعد از اولین تزریق با روش ایمونوباتل تأیید شد. این سنجش در خوکچه هندی به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در بررسی استئوآرتریت، آرتریت روماتوئید، سرطان، فیبروز کبدی و آترواسکلروز کاربرد دارد (۳۷).

۱) خالص سازی Sub(2)-α آنتی پلاسمین

Sub(2)-α آنتی پلاسمین، گلیکوپروتئین پلاسمایی است که مهارکننده فیزیولوژیک پلاسمین می باشد. در روشهای قبلی از آنتی بادیهای مونوکلونال برای خالص سازی آن استفاده شده است که شامل چند مرحله بوده و مقدار محصول کم می باشد. همچنین تهیه آنتی بادیهای مونوکلونال تجهیزات و هزینه زیادی نیاز دارد. اما با سرمایه گذاری نسبتاً کم مقدار زیادی آنتی بادی ویژه از زرده تخم مرغ بدست آمده که در کروماتوگرافی میل ترکیبی برای تخلیص گلیکوپروتئین مذکور استفاده شده است (۳۸).

(۴۹)، توکسین E.coli (۵۰) و استفاده از IgY به عنوان حامل داروهای ضدسرطان (۵۱) گزارش شده است.

نتیجه گیری و چشم انداز آینده:

ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ با ساختمان مولکولی و مشخصات منحصر بفرد می تواند به عنوان جایگزین آنتی بادیهای پلی کلونال موجود در بسیاری از روشهای ایمونوشیمیایی و نیز ایمونوتراپی استفاده شود. خالص سازی IgY با روشهایی مانند کروماتوگرافی های T-gel و میل ترکیبی جهت بدست آوردن IgY های ویژه کارایی زیادی دارد ولی به دلیل عدم اتصال پروتئین A استافیلوککی و پروتئین G استرپتوککی نمی توان از این پروتئینها برای خالص سازی IgY استفاده نمود.

کاربرد IgY در کیت های آزمایشگاهی و نیز به عنوان دارو نیاز به مطالعات بیشتری در مورد پایداری آن در شرایط مختلف (دما، اسید، باز، آنزیمها و ...) فرمولاسیون دارویی و اثرات جانبی IgY دارد و با نگاهی به IgY در آینده ای نزدیک شاهد طراحی روشهای جدید ایمونواسی و ایمونوتراپی با هزینه کمتر و کارایی بیشتر خواهیم بود.

همولیتیک وابسته به فسفولیپاز A2 را مهار کرده و اثرات ضدسمی مؤثری نشان داد (۴۴).

۶) IgY علیه M6P/IGF II-R (رسپتور Mannose-6-Phosphate/insulin-like (growth-factor –II

در انتقال آنزیمهای لیزوزومی نوساخته، تخریب IGFII و فعال سازی TGFbeta نقش دارد. این رسپتور توسط ژن متوقف کننده تومور کد می شود. این پروتئین از پروتئینهای حفاظت شده (Conserved) پستانداران است لذا میزبانهای مانند خرگوش و گوسفند نمی توانند آنتی بادیهای خوبی علیه آن تولید کنند. مرغها به دلیل فاصله فیلوژنتیکی با پستانداران، میزبان خوبی برای تولید آنتی بادی علیه M6P/IGF II-R هستند. مقدار این رسپتور در تعدادی از سلولهای توموری کمتر از سلولهای طبیعی است. بنابراین شناسایی و اندازه گیری مقدار آن در تشخیص و پیگیری درمان تعدادی از سرطانها اهمیت دارد (۴۵).

همچنین کاربردهای تشخیصی یا درمانی IgY های تولید شده علیه گونه های مختلف ویروس آنفلونزا (۴۶)، فاکتور انعقادی فون ویلبراند (۴۷)، کاتپسین D (۴۸) اکتیوین A



References

1. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology. Clin Chem 1990; 36 (8) : 1408-27.
2. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques, an overview. J Immunol Methods 1992; 150:5-21.
3. Pour – Amir M, Rasae MJ, Djalali M, Malekaneh M. Determination of serum cortisol level by a direct enzyme immunoassay using penicillinase as label . Med J IRAN 1998; 11(4): 335-40.

۴. پورامیر م ، رسائی م ج ، انصاری م ، پوربهادر ر ، ملکانه م . بررسی اثر Fab پلی کلونال آنتی دیگوکسین بر مسمومیت ناشی از افزایش مصرف دیگوکسین در خرگوش . مجله علمی - پژوهشی دانشور ۱۳۷۸ : ۶ (۲۳) : ۸ - ۱.
5. Pour – Amir M, Rasaee MJ, Ansari M, Malekaneh M, Hadjizadeh S. Preparation of immunogen and purification of high affinity and specificity Fab fragment of anti diogoxin polyclonal antibodies. *Iranian Asthma Allergy Immunol* 2000; 1:11-16.
 6. Larsson A, Mellestedt H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti mouse antibodies in ELISA after invivo treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1992; 11(1):33-9.
 7. Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2001; 15(9): 708-12.
 8. Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995; 16(8): 392-8.
 9. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods* 1998; 215:1-7.
 10. Larsson, Sjoquist J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comp Immunol Microbial Infect Dis* 1990; 13(4): 199-201.
 11. Schade R, Schniering A, Hlinak A. Polyclonal avian antibodies extracted from egg yolk as an alternative to the production of antibodies in mammals – a review. *ALTEX* 1992; 9 (2): 43-56.
 12. Larsson A, Karisson Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors . *Clin Chem* 1991; 37(3) : 411-14.
 13. Kronvall G, Seal US, Finstad J, Williams RCJ. Phylogenetic insight into evolution of mammalian F fragment of IgG globulin using staphylococcal protein A. *J Immunol* 1970; 104 : 140-5.
 14. Shimizu M, Nagashima H, Sano K, Hashimoto K, Ozeki M, Tsuda K, Hatta H. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci Biotech Biochem (Tokyo)* 1992 ; 56(2): 270-4.
 15. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification . *J Food Sci* 1992; 57(3): 629-34.

16. Pour-Amir M, Rasae MJ, Qujeq D, Assadi –karam GR. A simple and economical procedures for the purification of immunoglobulin Y (IgY) from egg yolk by T-gel chromatography. *Iranian Asthma Allergy Immunol* 2000; 1(2):53-57.
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): 207-14.
18. Nakarutimana V, Demedts P, Van scande M, Sharpe S.A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. *J Immunol Methods* 1992; 153 : 133-40.
19. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure . *Immunol Invest* 1990; 19 (3) :253-8.
20. Chang HM, Lu Tc, Chen CG, Tu YY , Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (4):995-9.
21. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Coch C. Eggs: conveniently packaged antibodies , methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* . 1981;46: 63-8.
22. Polson A, Coetzer T, Kruger J, Von Matzahn E, Vander Merwe KJ. Improvement in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens . *Immunol Invest* 1985; 14 (4): 323-7.
23. Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody (IgY). *Agric Biol Chem* 1990 ; 54(10): 2531-5.
24. Voet D, Voet JC. *Fundamental of biochemistry*, 2nd ed. John wiley and sons ed 1995; PP: 71-103.
25. Walker JM. *The protein protocols handbook* . Human press , USA 1996; PP: 721-47.
26. Hassl A, Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins , a two – step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration . *J Immunol Methods* 1998; 110:225-8.
27. Ferencik M. *Handbook of immunochemistry*. Chapman Hall co 1993; PP:191-228.
28. Sheehan D. *Physical biochemistry , principles and applications* . John wiley and sons , Ltd 2000; PP:30-3.

۲۹. پورامیر م. رسائی م ج. خالص سازی ایمونوگلوبولین (IgY) از زرده تخم مرغ با روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون . مجله علمی – ترویجی دانشگاه علوم پزشکی بابل . ۱۳۸۰ : س ۳ ش ۱۱: ۷-۱۰.

30. Fassina G, Verdoliva A, Palombo G, Ruvo M, Gassani G. Immunoglobulin specificity of TC 19318: a novel synthetic ligand for antibody affinity purification . J Mol Recognit 1998; 11:128-33.
31. Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvitikova I, Srinivas V, Caro J. General applicability of chicken egg yolk antibodies. FASEB J 1999; 13(1) : 81-8.
32. Porath J, Maisano F, Belew M. Thiophilic adsorption – a new method for protein fractionation. FEBS Lett 1985; 185(2) : 306-10
33. Scoble JA, Scopes RK. Ligand structure of the divinylsulfone – based T-gel . J Chromatogr A 1997; 787:47-54.
34. Scoble JA, Scopes RK . Assay for determining the number of reactive groups on gels used in affinity chromatography and its application to the optimisation of the epichlorohydrin and divinylsulfone activation reactions. J Chromatogr A 1996; 752:67-76.
35. Staak C. Egg yolk antibodies (IgY) in routine diagnostic Work . ALTEX 1996; 13(5) : 73-5.
36. Doellgast GJ, Brown JE, Koufman JA, Hatheway CL. Sensitive assay for measurment of antibodies to clostridium botulinum neurotoxins A,B,E: Use of hapten – labeled – antibody elution to isolate specific complexes . J Clin Microbiol 1997; 35 (3) : 578-83.
37. De Ceuninck F, Pastoureau P, Agnellet S, Bonnet J, Vanhoutte PM. Development of an enzyme – linked immunoassay for the quantification of YKL – 40 (Cartilage gp – 39) in guina pig serum using hen egg yolk antibodies . J Immunol Methods 2001; 252 (1-2) ; 153-61.
38. Lee SC, Lee Kyung N, Schwartzott DG, Jackson KW, Tae Weon C, Mckee PA. Purification of human alpha sub (2) – antiplasmin with chicken IgY specific to its carboxy – terminal peptide. Prepara Biochem Biotech 1997; 27(4): 227-37.
39. Carlander D, Koolberg H, Wejaker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections . Immunol Res 2000; 21(1):1-6
40. Sugita – Konishi Y, Shibata K, Yun SS, Hara Kudo Y, Yamaguchi K, Kumagai S. Immune Functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria . Biosci Biotech Biochem (Tokyo) 1996; 60(5): 886-8.

41. Shimizu M, Miwa Y, Hashimoto K, Koto A. Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulinG (IgY) by liposomes. *Biosci Biotech Biochem* 1993; 57(9): 1445-9.
42. Hatta H, Tsuda K, Ozeki M, et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to streptococcus mutans . *Caries Res* 1997; 31(4) : 268-74.
43. Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to streptococcus mutans glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries . *Infect Immun* 2001; 69(5) : 3135 – 42.
44. Almelda CM, kanashiro MM, Rangel Filho FB, Nata MF, Kipnis TL , Da Silva WD. Development of snake antivenom antibodies in chicken and their purification from yolk. *Vet Rec* 1998; 143(21):579-84.
45. Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Brouillet JP. High affinity antibodies from hen's egg yolk against human mannose – 6- hosphate/ insulin – like growth factor receptor (M6p/ IGF II- R) : characterization and potential use in clinical cancer studies . *Int J Cancer* 1999; 80(8) : 896-902.
46. Cuceanu N, Constantinescu C, Ionita E. Isolation and characterization of egg yolk antibodies IgY from hens immunized with different influenza virus strains. *Rum Arch Microbiol Immunol* 1991; 50(3) : 215- 22.
47. Toti F, Gachet C, Ohlmann P, et al . Electrophoretic studies on molecular defects of von willebrand factor and platelet glycoprotein II b- III a with antibodies produced in egg yolk from laying hens. *Haemostasis* 1992; 22(1): 32-40.
48. Fortgens PH, Dennison C, Eiliott E. Anti cathepsin D chicken IgY antibodies : characterisation , cross – species reactivity and application in immunogold labelling of human splenic neutrophils and fibroblasts. *Immunopharmacology* 1997; 36(2-3) : 305-11.
49. Murata T, Saito S, Shiozaki M, et al . Anti – activin A antibody (IgY) specifically neutralizes various activin A activities . *proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211(1): 100-7.
50. Akita EM, Li – Chan ECY, Nakai S. Neutralization of enterotoxigenic escherichia coli heat – labil toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigenbinding fragments. *Food Agricul Immunol* 1998; 10(2):161-172.
51. Yang J, Jin Z, Yu Q, Yang T, Wang H, Liu L. The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers . *Chin J Biotechnol* 1997; 13(2):85-90.

* آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه علوم پزشکی بابل، بخش بیوشیمی، تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۱۱۱