Archive of SID

مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي كردستان/ دوره دهم/ تابستان ۱۳۸٤، ۱۸-۱۰

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

شهلا کرانی[۱]، دکتر علی مصطفایی[۲]، دکتر زهیر حسن[۳]، عباس رستمیان[٤]، نسیم خزایی[٥]

۱- مربی بیوشیمی گروه بیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- دانشیار ایمنولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (مؤلف مسئول) amostafaie@kums.ac.ir

۳- استاد ایمنولوژی گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- مربی زیست شناسی سلولی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۵- مربی بیوشیمی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده

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

روش بررسی: پس از ایمن‌سازی مرغ علیه IgG خالص انسانی،IgY اختصاصی از زرده با روش محلول‌سازی در آب مقطر اسیدی استخراج و با روش‌های ترسیب توسط پلی‌اتیلن گلیگول۶۰۰۰ (PEG) و کروماتوگرافی جذبی تخلیص شد. برای تخمین وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک محصول، به‌ترتیب از روش‌های الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) و ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) و برای اندازه‌گیری فعالیت آن از آزمون الایزا استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که IgY ضد IgG انسان با راندمان بیش از ۷۵ درصد و خلوص نزدیک به ۹۹ درصد بدست آمده است. بعلاوه، وزن مولکول کامل IgY معادل ۱۹۰ و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به‌ترتیب ۲۷ و ۶۷ کیلودالتون تخمین زده شد.

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

کلید واژه‌ها: IgY، IgG انسان، کروماتوگرافی جذبی، تخلیص

وصول مقاله: ۸۴/۲/۱۸ اصلاح نهایی: ۸۴/۷/۲۶ پذیرش مقاله: ۸۴/۹/۲۲

مقدمه

IgY عمده‌ترین کلاس آنتی‌بادی در سرم پرندگان است. نام این کلاس آنتی‌بادی به دلیل فراوانی آن در زرده است (۲-۱). IgY از نظر ساختمان و عملکرد، تفاوتهای قابل توجهی با ایمونوگلوبولین‌های سرم پستانداران از جمله IgG دارد (۳).

برای مثال این آنتی‌بادی قابلیت اتصال به پروتئین G استرپتوکوک یا پروتئین A استافیلوکوک را ندارد (۵-۴). سیستم کمپلمان را فعال نمی‌سازد (۷-۶) و به فاکتور روماتوئیدی (RF) وصل نمی‌شود (۸). بعلاوه IgY از نظر وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و میل اتصال نیز با IgG پستانداران تفاوت دارد (۱۰-۹).

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 نمود و آنتی‌بادی با تیتر و تمایل بیشتری نسبت به میزبانهای پستاندار تولید کرد (۱۱-۶). بعلاوه

www.SID.ir

Archive of SID

تولید آنتی‌بادی از زرده، محصول عمل بیشتری نسبت به تولید آنتی‌بادی در حیوانات آزمایشگاهی دارد (۱۲) و نیازمند استفاده از روشهای تهاجمی مانند خونگیری و استرس بر حیوان و آزمایشگر نیست (۱۳).

از سالها پیش تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از IgY به اهداف تشخیص طبی و همچنین استفاده درمانی آن علیه انواعی از عوامل عفونی بخصوص عوامل عفونی بیماریهای روده‌ای صورت گرفته است (۱۶-۱۴). با توجه به اهمیت روزافزون IgY، محققین روشهای مختلفی برای تولید این نوع آنتی‌بادی در مرغ و تخلیص آن از زرده تخم مرغ یافته‌اند (۴و ۱۱و ۱۹-۱۷). تفاوت این روشها که عمدتاً بر پایه اشکال مختلف کروماتوگرافی طراحی شده‌اند، در درجه خلوص و راندمان محصول عمل می‌باشد. به دلیل اهمیت اندازه‌گیری IgG در تشخیص طبی، در این مطالعه آنتی‌بادی ضد آن در مرغ تولید گردید و این آنتی‌بادی از زرده تخلیص و تعیین خصوصیت گردید.

روش بررسی

ایمن‌سازی مرغ‌ها: IgG خالص انسان (سیگما) در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات نمکی (PBS) حل و با فیلتر۰/۲ میکرون استریل گردید. به یک حجم از محلول IgG یک حجم ادجوان کامل فروند (سیگما) اضافه و بخوبی مخلوط گردید تا امولسیون غلیظی از آن تهیه شد. به هر مرغ ۰/۵ 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 دمای۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج IgY از زرده

استخراج IgY از زرده به روش آکیتا و ناکایی انجام گرفت (۱۲). برای این‌کار ابتدا زرده تخم مرغ ازسفیده آن، جدا و با آب دیونیزه شسته شد. سپس غشای محافظ آن جدا و دور انداخته شد. زرده ۱۰ بار با محلول اسیدکلریدریک سه میلی‌مولار سرد، رقیق گردید تا سوسپانسیونی با pH نهایی پنج بدست آمد. سوسپانسیون حاصله مدت شش ساعت در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد در ۱۵۰۰۰×g سانتریفوژ گردید. محلول رویی از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد و برای مراحل بعد نگهداری شد.

خالص سازی IgY

مرحله اول خالص‌سازی IgY ترسیب با پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (مرک) بود که با تغییراتی نسبت به روش پولسن (۲۰) انجام گرفت. برای این‌کار، از محلول PEG ۴۰ درصد در آب مقطر، به عصاره پروتئینی حاوی IgY اضافه شد تا غلظت نهایی PEG در آن به ۱۲درصد رسید. اینکار در دمای اتاق و روی همزن مغناطیسی انجام گرفت. مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد در ۱۰۰۰۰×g سانتریفوژ گردید. رسوب از مایع رویی جدا و برای مرحله بعدی نگهداری شد.

مرحله نهایی تخلیص IgY با استفاده کروماتوگرافی جذبی که واجد لیگاند IgG انسانی بود، انجام گرفت. برای اینکار دو گرم سفاروز۴ بی فعال‌شده با سیانوژن برمید (فارماسیا) سه بار هر بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک میلی‌مولار شسته شد تا متورم گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

برای رسوب دادن ژل از سانتریفوژ (g×۸۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه) استفاده شد. ۱۵میلی‌لیتر محلول IgG خالص انسانی در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۸/۵ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار به ژل اضافه شد. مخلوط، ۲ ساعت در دمای اتاق بر روی روتاتور با حرکت آرام قرارگرفت. سپس به آن ۱۰۰میلی‌لیتر محلول گلیسین ۰/۲ مولار با pH=۸ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار اضافه گردید و برای حداقل ۲ ساعت در دمای اتاق قرارگرفت. مایع رویی دکانته شد و ژل ۵ بار به طور متناوب با دو نوع بافر استات ۰/۱ مولار با pH ۴ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار و تریس ۰/۱ مولار با pH ۸ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار شسته شد. ژل حاصله در یک ستون شیشه‌ای مناسب ریخته شد. سپس با مقدار کافی از PBS شسته شد تا به تعادل رسید. رسوب حاوی IgY در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS حل گردید و در هر آزمون حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از آن با سرعت ۱۰میلی‌لیتر در ساعت وارد ستون شد. پس از ورود نمونه، جریان PBS با سرعت ۲۰ میلی‌لیتر در ساعت بر ستون برقرار گردید. پس از رسیدن جذب مایع خروجی به حدود صفر (در طول موج ۲۸۰ نانومتر) بافر گلیسین ۰/۱ مولار با pH ۲/۸ با سرعت ۱۰ میلی‌لیتر در ساعت بر ستون اعمال شد. مایع خروجی در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری در لوله‌های آزمایش که قبلاً مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر بافر تریس- HCl یک مولار با pH۸ درآنها ریخته شده بود، جمع‌آوری گردید.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

غلظت پروتئین به روش UV اندازه‌گیری گردید (۲۱). در این روش جذب نمونه‌ها درطول موج‌های ۲۸۰ و۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (شیماتزو، ژاپن) اندازه‌گیری و غلظت پروتئین طبق فرمول زیر محاسبه شد.

(۰/۷۶×جذب در۲۶۰ نانومتر)- (۱/۵۵×جذب در۲۸۰ نانومتر)=(mg/ml) غلظت پروتئین

غلظت IgY خالص نیز به روش uv طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

ضریب خاموشی IgY/ جذب در۲۸۰ نانومتر =(mg/ml) غلظت پروتئین

ضریب خاموشی IgY خالص $\varepsilon = 1.4 \frac{cm^{-1}mg^{-1}}{ml}$ در نظر گرفته شد (۲۲).

الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات

SDS-PAGE غیراحیایی بر اساس روش لاملی (۲۳) در ژل جداکننده ۱۰ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد و SDS-PAGE احیایی در ژل جداکننده ۱۳/۵ درصد و ژل متراکم‌کننده ۴ درصد انجام گرفت. چهار حجم نمونه به یک حجم بافر نمونه (۵x) افزوده شد و پنج دقیقه درآب جوش قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی R-۳۵۰ (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد. در موارد لازم، تراکم و درصد باندهای پروتئین در ژل با دستگاه تراکم‌سنج (هلنا) تعیین گردید.

اندازه‌گیری فعالیت IgY با آزمون الایزا

فعالیت آنتی‌بادی ضد IgG با روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای اینکار، به هر چاهک میکروپلیت (نانک) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول IgG انسانی با غلظت ۱۰ میکروگرم درمیلی‌لیتر درPBS اضافه گردید. میکروپلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از زمان فوق، محتوای

www.SID.ir

Archive of SID

چاهک‌ها تخلیه و۲۵۰ میکرولیتر PBS حاوی توین بیست ۰/۵ درصد اضافه شد و پلیت‌ها ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پلیت‌ها سه بار با محلول PBS حاوی توین بیست ۰/۰۵ درصد (PBS-T) شسته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده با PBS-T به حالت دوبله به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پلیت‌ها پنج بار با PBS-T شسته شد. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی خرگوشی ضد IgY (گونژوگه با آنزیم پراکسیداز از شرکت سیگما) که ۴۰۰۰۰ بار با PBS-T رقیق شده بود، به چاهک‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. پلیت‌ها پنج بار با محلول PBS-T شسته شد و در نهایت۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (داکو) به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش پس از ۱۵ دقیقه با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک پنج درصد متوقف گردید و جذب چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر توسط الایزا ریدر (Bio-TEK instruments) خوانده شد.

ایزوالکتروفوکوسینگ

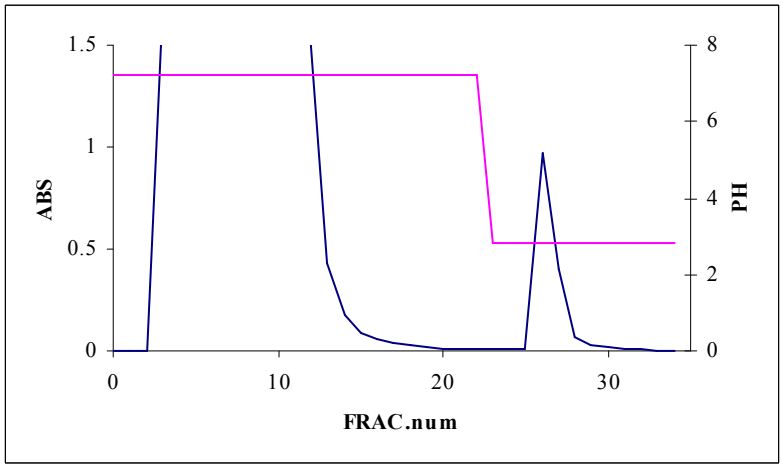
ایزوالکتریک فوکوسینگ به روش آبگیری مجدد در محدوده pH ۴-۸ انجام گرفت (۲۴، ۲۵). برای این کار، ژل پلی‌آکریل آمید در غلظت ۴/۲ درصد در عدم حضور آمفولیت‌ها و مواد حل‌کننده پروتئین بر روی طلق‌های قابل اتصال به ژل (GelBond PAG film) تهیه شد و پس از شستشو و خشک‌کردن، در حضور اوره ۹ مولار، CHAPS دو درصد، آمفولیت ۶ درصد (v/v) (به نسبت مساوی از آمفولین ۶/۵-۴ و ۸-۵) و DTT ۲۰ میلی‌مولار مجدداً متورم گردید. نمونه‌ها در بافر حل‌کننده حاوی اوره ۹ مولار، CHAPS ۴ درصد، آمفولیت ۲ درصد (به نسبت مساوی از آمفولین ۶/۵-۴ و ۸-۵) و DTT ۸۰ میلی‌مولار حل شد. نمونه‌گذاری با کاغذهای نمونه‌گذاری در نزدیکی کاتد انجام گرفت. قبل از نمونه‌گذاری، ژل برای مدت ۲۰ دقیقه در ولتاژ ۷۰۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از نمونه‌گذاری، الکتروفورز در سه مرحله صورت گرفت. ابتدا مرحله نفوذپذیری به مدت ۶۰ دقیقه در شیب ولتاژ ۵۰۰ - ۰/۰ ولت صورت گرفت. سپس کاغذهای نمونه‌گذاری برداشته شد و ژل به مدت ۴ ساعت در ولتاژ۲۵۰۰ ولت (مرحله جداسازی) و سپس ۲۰ دقیقه در ولتاژ ۳۰۰۰ ولت (نازک شدن باندها) الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با کوماسی۲۵۰-G رنگ‌آمیزی شد (۲۳).

یافته‌ها

با توجه به غلظت تام پروتئین و مقدار نسبی IgY در عصاره اسیدی زرده، معلوم گردید که IgY ۱۷-۱۵ درصد محتوای پروتئینی این عصاره را تشکیل می‌دهد. بعد از کروماتوگرافی جذبی که نتیجه آن در شکل ۱ آمده است، ۵-۴ درصد بخش IgY موجود در عصاره به ستون چسبید. این کروماتوگرام حاوی دو قله پروتئینی عمده بود. قله اول که همراه بافر شوینده از ستون خارج گردید، مربوط به پروتئینهای عصاره زرده غیر از آنتی‌بادی ضد IgG انسان است. قله دوم که بعد از تغییر pH توسط گلیسین از ستون خارج گردید، مربوط به IgY ضد IgG انسان است که ۵-۴ درصد محتوای IgY و حدود ۰/۵ درصد محتوای پروتئینی زرده را تشکیل می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: کروماتوگرافی جذبی عصاره زرده در ستون سفاروز٤بی حاوی لیگاند IgG انسان

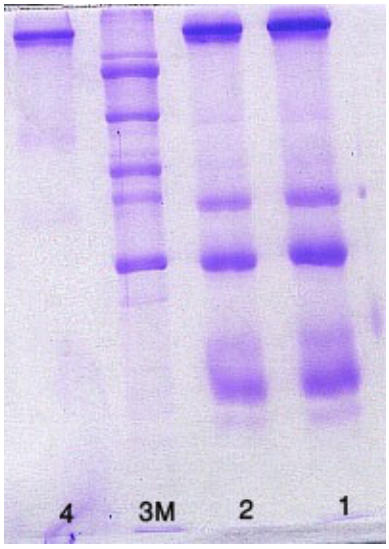
الکتروفورز مربوط به دو قله حاصل از کروماتوگرافی جذبی در اشکال ۳ و۲ آمده است. شکل ۲ الکتروفورز غیراحیایی محتوای این دو قله در مقایسه با فراکسیون PEG را نشان می‌دهد.

ستون ۱ در این شکل مربوط به پروتئین‌های ترسیب نموده توسط PEG است که حاوی چندین باند پروتئین پرمقدار و انواعی از پروتئین‌های کم مقدار است.

ستون ۲ مربوط به قله اول و شامل تقریباً تمام پروتئین‌های ترسیب شده توسط PEG می‌باشد و الگوی آن شباهت زیادی با ستون ۱ دارد.

ستون ۳ مربوط به بخش جذب‌شده به ستون جذبی است که به صورت یک باند در موقعیت وزنی ۱۹۰ کیلودالتون در مقایسه با مارکرهای وزن مولکولی بالا (فارماسیا) دیده می‌شود.

نتایج تراکم‌سنجی نشان داد که خلوص این پروتئین از ۱۶/۴ درصد در فراکسیون PEG (ستون ۱) به نزدیک ۹۹ درصد در کروماتوگرافی جذبی رسیده است (ستون ۴) و ناخالصی آن نامحسوس است.



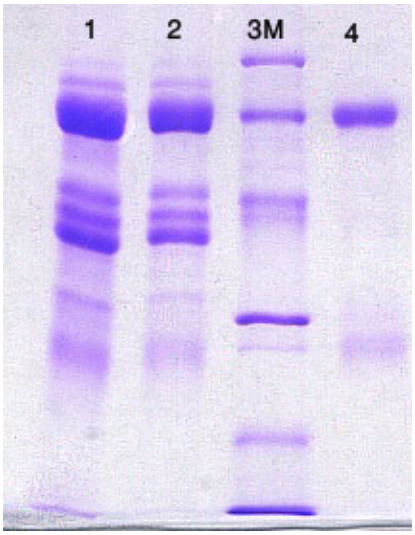
شکل۲: SDS-PAGE غیراحیایی پروتئین‌های فراکسون PEG (ستون۱)، قله اول (ستون۲) و قله دوم (ستون۳) کروماتوگرافی جذبی. ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان ۵۳، ۷۶، ۱۱۶، ۱۷۰، ۲۱۲ کیلو دالتون است.

در شکل ۳ الکتروفورز احیایی نمونه‌ها آمده است. ستون ۳ این شکل مربوط به محتوای قله دوم کروماتوگرافی جذبی است که به صورت دو باند مشخص دیده می‌شود. این دو باند که مربوط به زنجیره‌های سبک و سنگین IgY است، در مقایسه با

www.SID.ir

Archive of SID

مارکرهای وزنی پایین (فارماسیا) به ترتیب در موقعیت ۶۷ و ۲۷ کیلودالتون قرار دارند. این نوع الکتروفورز نیز خلوص محصول بدست‌آمده را به وضوح نشان می‌دهد.



شکل۳: SDS-PAGE احیایی پروتئین‌های فراکسون PEG (ستون۱) ، قله اول (ستون۲) و قله دوم (ستون۳) کروماتوگرافی جذبی. ستون M از پایین به بالا شامل مارکرهای وزنی با اوزان ۱٤/٤، ۲۰، ۳۰، ٤٥، ٦۷، ۹۷ است.

بررسی راندمان فعالیت محصول IgY با روش الایزا نشان داد که محصول بدست آمده بیش از ۷۵ فعالیت تام آنتی‌بادی دارا می‌باشد.

الگوی IEF پروتئین‌های عصاره در مقایسه با IgY بدست آمده به روش‌های کروماتوگرافی جذبی در شرایط واسرشته‌کننده در دامنه ۸-۴ pH آمده در شکل ۴ آمده است. در این شرایط زنجیره سنگین و سبک IgY به صورت دو منطقه منتشره، به‌ترتیب در محدوده pH ۵/۱-۴/۸ و pH ۵/۴-۵/۲ دیده می‌شوند. با توجه به پلی‌کلونال بودن آنتی‌بادی، بخش عمده این دو زنجیره به صورت دو باند مشخص، به ترتیب در pH ۵ و pH ۵/۲۵ قرار دارد که بیانگر نقاط ایزوالکتریک آنها در شرایط آزمایش است.

شکل٤: ایزوالکتریک فوکوسینگ پروتئین‌های فراکسیون PEG (ستون بالا)، محصول کروماتوگرافی جذبی (ستون پایین) و مارکرهای محدوده باز (فارماسیا) (ستون وسط).

بحث

IgY عمده‌ترین کلاس آنتی‌بادی در سرم پرندگان است که تفاوت ساختمانی و عملکردی زیادی با IgG پستانداران دارد (۱۰-۴). فراوانی این آنتی‌بادی در زرده، عدم نیاز به روشهای تهاجمی مانند خونگیری و

www.SID.ir

Archive of SID

امکان تولید آن بر علیه انواعی از آنتی‌ژنها باعث شده تا به عنوان منبع مهم و قابل توجهی برای تولید آنتی‌بادی مطرح شود (۱۳-۹).

در مطالعه حاضر با ترکیبی از دو روش آب مقطر اسیدی و ترسیب با PEG پروتئین‌های زرده به نحو مناسبی محلول و از مواد لیپیدی زرده جدا گردید. آکیتا و ناکایی نشان داده‌اند که رقیق‌سازی با آب مقطر اسیدی روشی ساده و کارآمد برای استخراج پروتئین‌های آب‌دوست از جمله IgY از زرده تخم مرغ است (۱۷). با افزودن روش ترسیب با PEG در این مطالعه که بر اساس روش پولسن انجام گرفت (۲۰)، بخش حاوی IgY به شکل مطلوبی رسوب کرد و ادامه کار را ساده‌تر نمود. از جمله مزیتهای استفاده از PEG برای رسوب‌دهی پروتئین‌ها امکان کاربرد این ماده رسوب‌دهنده در دماهای بالاتر از صفر درجه سانتیگراد، بدون احتمال واسرشته‌شدن پروتئین‌ها می‌باشد (۲۶، ۲۷). بعلاوه در روش ترسیب با PEG بر خلاف ترسیب توسط نمک، رسوب حاصله 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 (۱۷).

پس از کروماتوگرافی جذبی که به عنوان مرحله نهایی تخلیص استفاده شد، محصول IgY اختصاصی با درجه خلوص بسیار بالا (نزدیک به ۹۹ درصد) و راندمان بیش از ۷۵ درصد بدست آمد. بعلاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که وزن مولکول کامل IgY حدود ۱۹۰ و وزن زنجیره‌های سبک و سنگین آن به ترتیب ۲۷ و ۶۷ کیلودالتون است. در مقایسه با این نتایج، وردولیوا و همکاران که از روش کروماتوگرافی جذبی با استفاده از لیگاند سنتزی (TG19318) برای خالص‌سازی IgY استفاده نمودند، توانستند محصولی با خلوص و راندمان به ترتیب ۹۰ و ۹۸/۵ درصد بدست آورند (۱). در مطالعه دیگری که توسط کوک و همکاران (۱۱) با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی بعد از ترسیب توسط سولفات آمونیوم انجام گرفت، میزان راندمان آنتی‌بادی حاصله ۸۱ درصد گزارش شد، ولی درجه خلوص گزارش نشد. بعلاوه این محققین نشان دادند که IgY اختصاصی بدست‌آمده نزدیک به یک درصد محتوای IgY زرده بوده است. اگرچه راندمان IgY در مطالعه حاضر از مطالعات کوک و وردولیوا کمتر بوده، ولی خلوص این محصول به میزان قابل توجهی بالاتر از مطالعات مشابه بوده است. بعلاوه نتایج این مطالعه حاکی از آن است ۵-۴ درصد محتوای IgY زرده را IgY اختصاصی تشکیل می‌دهد. این موضوع احتمالاً ناشی از شرایط مطلوبتر ایمن‌سازی مرغ‌ها بوده است.

در مطالعه فیچ‌تال و همکاران (۱۸) که از کروماتوگرافی تعویض کاتیونی برای خالص‌سازی IgY استفاده شد، میزان خلوص ۶۹-۶۰ درصد و راندمان ۶۰-۶۵ درصد گزارش گردید. در مطالعه دیگر، هاتا و همکاران (۱۹) از کروماتوگرافی تعویض آنیونی دی‌اتیل آمینواتیل سفاسل بعد از ترسیب توسط سولفات سدیم را برای تخلیص IgY استفاده کردند. نتیجه مطالعه آنها نشان داد که IgY با درجه خلوص و راندمان، به ترتیب ۹۸ و ۷۳ درصد بدست آمده‌است. کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) روش دیگری برای خالص‌سازی IgY است که هانسن و همکاران (۴) از آن استفاده کردند. لازم به توضیح است که روشهای کروماتوگرافی تعویض یون و تیوفیلیک اگرچه برای

www.SID.ir

Archive of SID

تخلیص IgY تام مفید هستند ولی برای تخلیص IgY اختصاصی قابل استفاده نیستند.

نتایج این مطالعه نشان داد، روش بکار رفته برای تخلیص IgY اختصاصی، روشی ساده، با خلوص بالا و با راندمان نسبتاً مناسب است و برای تخلیص IgY اختصاصی علیه سایر آنتی‌ژن‌ها در مقیاس کم یا زیاد عملی است. بعلاوه 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 با اهداف مختلف استفاده نمود. برای مثال IgY بدست آمده در مطالعه حاضر که علیه IgG انسانی است به اشکال مختلف در تشخیص طبی قابل استفاده می‌باشد.

References

1. Verdoliva A, Basile G, Fassina G. Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J chromatogr B. 2000; 749: 233-242.
2. Narat M. Production of antibodies in chickens. A review, Food technol Biotechnol. 2003; 41(3):259-267.
3. Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. 3 Immunoglobulins of the chicken. J Exp Med. 1969; 130(6):1337-1352.
4. Hansen P, Scoble JA, hanson B, Hoogenraad NJ. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol Methods.1998; 215(1-2): 1-7.
5. Kronvall G, Seal US, Finstad J, Williams RCJ. Phylogenetic insight into evolution of mammalian FC fragment of IgG globulin using staphylococcal protein. AJ Immunol. 1970; 104: 140-145.
6. Tini M, Jewel UR, Camenisch G, Chilov D, Gassmann M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. Comp Biochem 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.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli Strain. J Immunol Methods.1993; 160(2): 207-214.
18. Fichtal J, Charter EA, Lo KV, Nakai S. Purification of antibodies from industrial separated egg yolk. J Food Sci.1993; 58(6): 1285-1290.
19. Hatta H, Kim M and Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric Biol Chem.1990; 54(10): 2531-2535.
20. polson A, Von Wechmar M.B, Van Reggenortel MHV. Isolation of viral IgY antibodies from egg yolks of immunized hens. Immunol. Commun.1980; 9: 475-493.
21. Roe S. protein purification techniques. 2nd ed. 2001; PP. 28-32.
22. Linden CD, Roth TF. IgG receptors on fetal chick yolk sac. J Cell Sci.1978; 33: 317-328.
23. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophge T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
۲۴. مصطفایی علی. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل، چاپ دوم. انتشارات یادآوران. ۱۳۸۲، ص: ۶۱-۳۵.
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.

www.SID.ir