

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.

واژه های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، جداسازی، خالص سازی، تشخیص، درمان.

مقدمه

آنتی بادیهای پلی کلونال و اجزاء آن که از سرم حیوانات ایمونیزه شده بدست می آید 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 می کنند (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 می شود. همچنین نتایج تحقیقات اخیر در زمینه کاربردهای تشخیصی و درمانی IgY می باشد.

مشخصات و خواص مولکولی IgY

مطالعات اسپکترومتری جرمی نشان می دهد که وزن مولکولی IgY و زنجیره های سنگین و سبک آن بترتیب ۱۶۷۲۵۰، ۵۱۰۵۰، ۱۸۶۶۰ دالتون می باشد (۷).

سایر مشخصات و خواص IgY عبارتست از:

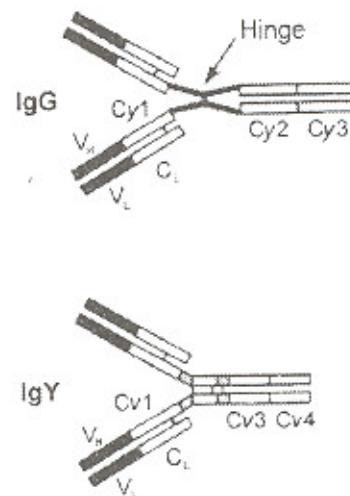
۱. وزن مولکولی زنجیر سنگین IgY بیشتر از وزن مولکولی زنجیر سنگین IgG پستانداران است (۷).
۲. وزن مولکولی زنجیر سبک IgY کمتر از وزن مولکولی زنجیر سبک IgG پستانداران است (۷).

۱۰. IgY در برابر گرما و اسید نسبتاً پایدار است ولی در مقایسه با IgG خرگوش، 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 خرگوش در زمان مشابه است (۱۵).
۱۲. ساختمان مولکولی IgY در مقایسه با آنتی بادهای خرگوش 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

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 می شود (۷).
۴. زنجیره سنگین IgY شامل پنج دومین (Domain) ساختمانی است و با وجود یک دومین 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 می شود (۱۰).
۷. IgY از سرم مرغ وارد زرده تخم مرغ شده و روزانه جمع آوری می گردد. بدون استفاده از روشهای تهاجمی مانند خونگیری می توان آنتی بادهای موجود در زرده را جدا و در ۴ درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری نمود (۱۱).
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 استریپتوکوکی واکنش نمی دهد و با رنگ «آبی درخشان کوماسی» واکنش کمی نشان می دهد (۱۳ و ۹).

روش	شرح روش
رقیق کردن زرده و سانتریفوژ در دور زیاد	در این روش زرده از سفیده جدا شده و بعد از شستن با آب دیونیزه، غشاء محافظ آن پاره و زرده جمع آوری می گردد. زرده را با محلول اسیدی رقیق و بعد از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰ و در دمای ۴ درجه، پروتئینهای زرده در سوپرناتانت ظاهر شده و لیپیدهای موجود در رسوب حذف میشوند (۱۷ و ۹).
حلالهای آلی	در این روش از حلالهای آلی هیدروکربن نظیر کلروفرم استفاده شده است که بعد از اتوکسامپون و سانتریفوژ لایه فوقانی که دارای پروتئین است جدا می شود (۱۹ و ۱۸).
پلی ساکاریدهای آنیونی	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 آنیونی مورد استفاده در این روش است (۲۱ و ۲۰).
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 کلروفرم به یک حجم زرده تخم مرغ افزوده شده و سپس از PEG (۱۲) استفاده می شود (۲۲ و ۱۹).
صمغ ها (Gums)	صمغ های طبیعی مانند Carrageenan و صمغ گزانتان باعث رسوب لیپوپروتئینهای زرده تخم مرغ می شوند (۲۳).

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 می شود. در این روش از ژلهای منفذدار استفاده می شود و ترکیبات براساس اندازه و شکل مولکولی جدا می گردند. انواع مولکولها بر اساس وزن مولکولی در مایع خروجی ظاهر شده و مولکولهای با وزن مولکولی بیشتر، زودتر خارج می شوند (۲۷-۲۹).

۴) کروماتوگرافی آفینیتی (میل ترکیبی)

کروماتوگرافی میل ترکیبی روش ویژه ای که برای تهیه ایمونوگلوبولینها بکار می رود، بر اساس جفت ترکیباتی است که ویژه هم هستند. به عنوان مثال زوج آنتی ژن (یاهپتن) و آنتی بادی را می توان ذکر کرد که این موارد از نوع کروماتوگرافی ایمونوآفینیتی است. یک آنتی ژن به عنوان لیگاند برای جداسازی آنتی بادی ویژه (مانند IgY آنتی ترانسفرین) عمل می کند (۳۱-۳۰). مولکولهای آنتی بادی متصل شده با شستشوی ویژه یا غیر ویژه رها می شوند. شستشوی ویژه ملایم تر است و غلظت زیاد لیگاند آزاد (هاپتن یا آنتی ژن) موجود در بافر شوینده باعث آزادسازی آنتی بادی و خروج آن از ستون می شود.

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 می دهد و عمدتاً به IgA, IgM, IgG و به مقدار کم به $\alpha 2$ - ماکروگلوبولین و ترانسفرین متصل می شود. این واکنشها وابسته به غلظت نمک می باشد.

ساختمان عمومی جاذب در T-gel را می توان بصورت $P-O-CH_2-CH_2-SO_2-CH_2-CH_2-S-R$ نشان داد که P ماتریکس پلیمر و R بنیان آلیفاتیک کوچک را نشان می دهد. برای تأکید بر اهمیت سولفات و انتهای سولفورتیواتر، این نوع بر همکنش (تیوفیلیک) نامیده شده است (۳۳-۳۴).

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 پروتئینها از زرده تخم مرغ، رسوبدهی انتخابی IgY با نمکهای مانند سولفات آمونیوم و سولفات سدیم می باشد. آخرین مرحله شامل روش کروماتوگرافی (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 یونهای 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 مختلف موجود در محلول آبی در غلظتهای نمکی متفاوت رسوب می کنند (۲۴) و از این پدیده برای جدا کردن آنها استفاده می شود. با این روش ایمونوگلوبولین نسبتاً خالص را میتوان از سرم پستانداران، مرغ و زرده تخم مرغ جدا کرد ولی پروتئینهای مزاحم کاملاً حذف نمی شود (۲۵).

۲) کروماتوگرافی هیدروفوبیک

در این نوع کروماتوگرافی، گروههای هیدروفوب مولکولهای جدا شونده با گروههای هیدروفوب مستقر در ستون کروماتوگرافی واکنش می دهند. 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 می ماند. این نوع کروماتوگرافی به همراه کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای خالص سازی IgY استفاده شده است (۲۶).

شامل چند مرحله بوده و مقدار محصول کم می‌باشد. 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).

۳) ایمونوتراپی 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 ایمونوتراپی با آنتی بادیهای خوراکی نظیر IgY مشخص می‌شود. IgY سیستم کمپلمان پستانداران را فعال نمی‌کند و با رسپتورهای FC واکنش نمی‌دهد، 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 می‌دهد که IgY های ویژه مانع عفونتهای باکتریایی و ویروسی می‌شوند (۴۰).

تحقیقات نشان می‌دهد که IgY محصور شده در داخل لیپوزوم در شرایط اسیدی و نیز در برابر تخریب آنزیمی (پپسین) تا حد زیادی فعال باقی می‌ماند (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 می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد 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 می‌دهد (۴۲). همچنین IgY علیه GBP-B (glucan binding protein B) استرپتوکوک موتان اثر حفاظتی در برابر پوسیدگی دندان و عفونت‌های 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

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، آنتی ژن و نشانهای نظیر رادیواکتیو، آنزیم و ماده فلورسنت انجام می‌شود، IgY به عنوان مولکولی واسط و یا به عنوان آنتی‌بادی نشاندار مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این موارد آنزیمهایی نظیر HRP (horseradish peroxidase) و مولکولهایی مانند FITC (Fluorescein isothiocyanate) به IgY متصل می‌شود (۳۶-۳۵).

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

۱) طراحی روش ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Enzyme linked برای اندازه گیری YKL-40

ELISA رقابتی غیرمستقیم برای اندازه‌گیری YKL-40 (gp-39 غضروفی) در سرم خوکچه هندی، با استفاده از آنتی‌بادیهای زرده تخم مرغ (IgY) طراحی شده است. وجود آنتی‌بادیهای ویژه یکماه بعد از اولین تزریق با روش ایمونوبلات 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 α -Sub(2) آنتی پلاسمین

α -Sub(2) آنتی پلاسمین، گلیکوپروتئین پلاسمائی است که مهارکننده فیزیولوژیک پلاسمین می‌باشد. در روشهای قبلی از آنتی‌بادیهای مونوکلونال برای خالص سازی آن استفاده شده است که

(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 ایمونوترابی 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 ایمونوترابی با هزینه کمتر و کارایی بیشتر خواهیم بود.

کشنده آن شد. این آنتی بادی فعالیت همولیتیک وابسته به فسفولیپاز A2 را مهار کرده و اثرات ضدسمی مؤثری نشان داد (۴۴).

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

در انتقال آنزیمهای لیزوزومی نوساخته، تخریب IGFII و فعال سازی TGFbeta نقش دارد. این رستپور 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 رستپور 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 (۴۹)، توکسین E.coli

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, Rasaee 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 S, Sjöquist 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, Sjöquist 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, Rasaee MJ, Quej D, Assadi-karam GR. A simple and economical procedure 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)Y 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 guinea 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 Fillho 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, Ohlmanm 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, Eliott 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.