● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم، شمارهٔ ۳ (پی‌درپی۱۱)، صفحه ٤٧ الی ٥٤، 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 جایگزینIgG 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 تخلیصIgY 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 پلی‌کلونال 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 پلی‌کلونال 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 آنتی‌بادیها با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش داده و در سنجشهای ایمونوشیمیایی « خطای مثبت » ایجاد می‌کنند (۶). زرده تخم‌مرغ سرشار از آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال است که این آنتی بادیها ایمونوگلوبولینY (ایمونوگلوبولین Yolk یاIgY) نامیده‌میشوند(۵-۱). ایمونوگلوبولینY در تحقیقات علوم پزشکی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها در سالهای اخیر کاربرد گسترده‌ای دارد. در این مطالعه مروری، ساختمان و خواصIgY و نیز روشهای جداسازی و خالص‌سازی آن بررسی می‌شود. همچنین نتایج تحقیقات اخیر در زمینه کاربردهای تشخیصی و درمانیIgY 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).

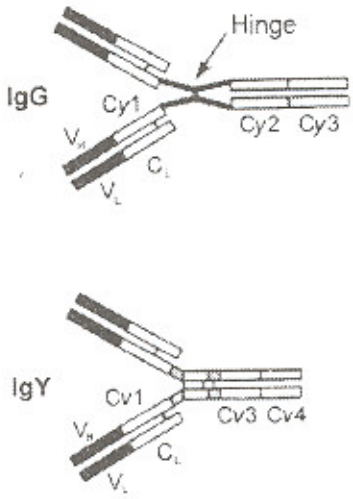
سایر مشخصات و خواص IgY عبارتست از :

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 دومین (Domain) ساختمانی است و با وجود یک دومین اضافی (نسبت به IgG پستانداران) فاقد منطقه لولایی شکل (Hinge) است (۸) (شکل ۱).



شکل۱. ساختمان مولکولی IgG پستانداران و IgY زرده‌تخم‌مرغ

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، آنتی‌بادی 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 تهاجمی مانند خونگیری می‌توان آنتی‌بادیهای 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 نمی‌شود و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی‌دهد(۱۲).

۹. IgY با پروتئین A استافیلوکوکی و پروتئین G استرپتوکوکی واکنش نمی‌دهد و با رنگ «آبی درخشان کوماسی» واکنش کمی نشان می‌دهد (۱۳و۹).

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 می‌آید 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 بادیهای 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 درتهیه IgY جداسازی بخش آبی که دارای IgY است، از بخش لیپیدی می‌باشد. پنج روش استاندارد برای جداسازی پروتئینهای زرده در جدول (۱) شرح داده شده است.

جدول۱.روشهای جداسازی پروتئین‌ها ازلیپیدهای زرده‌تخم 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 درg ۱۰۰۰۰ و در دمای ٤ درجه ، پروتئینهای زرده در سوپرناتانت ظاهر شده و لیپیدهای موجود در رسوب حذف میشوند (۱۷و۹).
حلالهای آلی	در این روش از حلالهای آلی هیدروفوب نظیر کلروفرم استفاده شده است که بعد از انکوباسیون و سانتریفوژ لایه فوقانی که دارای پروتئین است جدا می شود (۱۹و۱۸).
پلی ساکاریدهای آنیونی	برای حذف لیپیدها و لیپوپروتئینهای زرده‌تخم‌مرغ استفاده می‌شود 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 (۲۱و۲۰).
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 می‌شود. در روش دیگر ابتدا یک حجم کلروفرم به یک حجم زرده تخم مرغ افزوده شده و سپس از PEG (۱۲٪) استفاده می‌شود(۲۲و۱۹).
صمغ ها (Gums)	صمغ‌های طبیعی مانند Carrageenan و صمغ گزانتان 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 خالص‌سازی بعد از استخراج پروتئین‌ها از زرده تخم‌مرغ، رسوبدهی انتخابی IgY با نمکهایی مانند سولفات آمونیوم و سولفات سدیم می‌باشد. 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 می‌گیرد. روشهای استاندارد خالص سازی ایمونوگلوبولین Y به شرح زیر می‌باشند:

۱) رسوبدهی انتخابی با سولفات آمونیوم یا سدیم

حلالیت پروتئینها در محلولهای آبی بستگی به پوشش انحلال‌پذیری دارد، یعنی به لایه‌ای از مولکولها و یونهایی که پروتئینها را محاصره کرده‌اند. پوشش انحلال‌پذیری به دلیل نیروهای الکترواستاتیک و قطبی بین قسمتهای باردار و قطبی مولکول پروتئین و دو قطبی‌های آب تشکیل می‌شود. افزودن نمکهای خنثی نظیر سولفات آمونیوم و سولفات سدیم، ضخامت پوشش انحلال‌پذیری یا غلظت مؤثر آب را کاهش داده، حلالیت پروتئین مورد نظر را کم می‌کند. در غلظتهای مشخص از نمک، پروتئین نامحلول شده و رسوب می‌کند. پروتئینهای 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 می شوند (۲۹-۲۷).

۴) کروماتوگرافی آفینیتی (میل ترکیبی)

کروماتوگرافی میل‌ترکیبی روش ویژه‌ای که برای تهیه ایمونوگلوبولینها بکار می‌رود، بر اساس جفت ترکیباتی است که ویژه هم هستند. به عنوان مثال زوج آنتی‌ژن (یاهاپتن) 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) عمل می‌کند (۳۱-۳۰). 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) ومتصل به ۲- مرکاپتواتانول (2ME) با پروتئینهای سرم انسان واکنش می‌دهد و عمدتاً به IgA,IgM,IgG و به مقدار کم به $\alpha 2$ ـ ماکروگلوبولین و ترانسفرین متصل می‌شود. این واکنشها وابسته به غلظت نمک می باشد.

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

مکانیزم اتصال پروتئینها در T-gel بخوبی شناخته نشده است ولی مکانیزم احتمالی شامل تشکیل کمپلکس الکترون دهنده ـ 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 ویژهٔ تخم‌مرغ (IgY) و نیز مشکلات استفاده از روشهای رایج در تخلیص IgG ، محققین برای تخلیص IgY از T-gel استفاده می کنند.

کاربرد IgY در تحقیقات علوم پزشکی

در سنجشهای ایمنی (Immunoassays) که با استفاده از آنتی‌بادی، آنتی‌ژن و نشانهایی 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 نظیرHRP (horseraddsh peroxidase) و مولکولهایی مانند FITC (Fluorescein isothiocyanate) به IgY متصل می‌شود (۳۶– ۳۵).

IgY تولید شده علیه هورمونها، سموم، میکروارگانیزمها 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 روشELISA (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 تخم‌مرغ (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 Sub(2)-α– آنتی پلاسمین

Sub(2)-α آنتی پلاسمین ، گلیکوپروتئین پلاسمائی است که مهارکننده فیزیولوژیک پلاسمین می‌باشد. در روشهای قبلی از آنتی‌بادیهای مونوکلونال برای خالص‌سازی آن استفاده شده است که 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 تخم‌مرغ 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 IgYهای 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 استرپتوکک موتان می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که استرپتوکک موتان علت اصلی پوسیدگی دندان است. ایمونوگلوبولین Y تولید شده علیه استرپتوکک 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 وعفونت‌های ناشی از استرپتوکوک موتان دارد (۴۳).

۵) تولید IgY علیه سم مار: IgY تولید شده علیه سم نوعی مار (Brazilian snake) باعث شناساسی و خنثی کردن اجزاء سمی و

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 (رسپتور Mannose-6-Phosphate/insulin-like growth-factor –II)

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

همچنین کاربردهای تشخیصی یا درمانی IgYهای تولید شده علیه گونه‌های مختلف ویروس آنفلونزا (۴۶)، فاکتور انعقادی فون ویلبراند (۴۷)، کاتپسین D (۴۸) اکتیوین A (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 زرده‌تخم‌مرغ با ساختمان مولکولی و مشخصات منحصر بفرد می‌تواند به عنوان جایگزین آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال موجود در بسیاری از روشهای ایمونوشیمیایی و نیز ایمونوتراپی استفاده شود. خالص‌سازی IgY با روشهایی مانند کروماتوگرافی‌های T-gel و میل ترکیبی جهت بدست آوردن IgYهای ویژه کارآیی زیادی دارد ولی به دلیل عدم اتصال پروتئین Aاستافیلوککی و پروتئین G استرپتوککی نمی‌توان از این پروتئینها برای خالص سازی IgY استفاده نمود.

کاربرد IgY در کیتهای 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 آینده‌ای نزدیک شاهد طراحی روشهای جدید ایمونواسی و ایمونوتراپی با هزینه کمتر و کارآیی بیشتر خواهیم بود.

****

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.

٤. 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 :٦ (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 thiopilic interaction chromatography. J Immunol Methods 1998; 215:1-7.

10. Larrsson, Sjoequist 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, Rasaee MJ, Qujeq D, Assadi –karam GR. A simple and echonomical 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 echonomical 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, Aspock 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 Y(IgY) از زرده تخم مرغ با روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون . مجله علمی – ترویجی دانشگاه علوم پزشکی بابل . ۱۳۸ : س ۳ ش ۱۱:۱۰–۷.

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 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, 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: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱**