● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال ششم، شمارهٔ ۱ (پی‌درپی۲۱)، صفحه ۷ الی ۱۳، زمستان ۱۳۸۲
دریافت:۸۱/۷/۲۱، پذیرش: ۸۲/۲/۳۰

تهیه و تخلیص آنتی بادی آنتی ایمونوگلوبولین Y از خرگوش

دکتر مهدی پورامیر[۱*]، دکتر سلیمان محجوب[۱] ، دکتر قربان ملیجی[۲]
۱- استادیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه میکروبیولوژی ـ ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل

سابقه و هدف: آنتی بادیهای زرده تخم مرغ (IgY) نقش فزاینده ای به عنوان جایگزین آنتی بادیهای پلی کلونال پستانداران ایفاء می‌کنند. این آنتی بادیها در پیشگیری، تشخیص و درمان بیماریها مورد استفاده قرار می گیرند. آنتی بادیهای آنتی IgY در سنجشهای ایمنی و درمان کاربرد دارند. هدف از این تحقیق تهیه و تخلیص آنتی ایمونوگلوبولین Y از سرم خرگوش و تایید فعالیت آن بود.

مواد و روشها: در این مطالعه IgY و سایر پروتئینهای محلول در آب تخم مرغ با استفاده از با اسید و کلروفرم استخراج شدند و سپس کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) برای خالص سازی IgY استفاده گردید، سپس دو سر خرگوش ماده با ایمونوگلوبولین Y تخلیص شد، به همراه ادجوانت فروند ایمونیزه شدند، تزریقهای بوستر و خونگیری در زمانهای معین انجام شد. رسوبدهی توسط آمونیوم سولفات و بعد کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون یا کروماتوگرافی T-gel جهت خالص سازی آنتی IgY انجام گردید. از الکتروفورز استات سلولز و ایمونودیفوزیون دو طرفه و ELISA برای تأیید ماهیت و فعالیت آنتی بادی علیه IgY استفاده شد.

یافته‌ها: الکتروفورز محصول خالص شده (IgY) در ناحیه گاما گلوبولین مشاهده شد. آنتی بادیهای خالص شده از سرم خرگوش در ناحیه گاماگلوبولین ظاهر شدند که در ایمونودیفوزیون دو طرفه علیه IgY واکنش داده و تیتر آنتی بادی در ELISA یک ده هزارم بدست آمد.

نتیجه‌گیری: این آنتی بادیها می‌توانند در سنجشهای ایمنی برای شناسایی و سنجش انواع مولکولها به عنوان معرف آنتی ایمونوگلوبولین Y کاربرد داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: *ایمونوگلوبولین Y، آنتی بادی آنتی IgY، خرگوش، خالص سازی.*

مقدمه

آنتی‌بادیهای زرده تخم‌مرغ (IgY)، مرغهای ایمونیزه شده کاربردهای تشخیصی و درمانی دارند. IgY فعال در طراحی انواع روشهای ایمونوشیمیایی مانند تکنیکهای ELISA ، وسترن بلاتینگ (۲و۱) و نیز در ایمونوتراپی برای پیشگیری و درمان عفونتهای روده‌ای(۳)، ایمونیزاسیون غیرفعال برای پیشگیری و درمان پوسیدگی دندان(۴)، به عنوان حامل داروهای ضدسرطانی(۵)، به عنوان پادزهر (Antidote) در مسمومیتهای با سموم (۶) و نیز IgY علیه گونه‌های مختلف ویروس آنفلونزا (۷) و توکسین E.Coli (۸) مورد استفاده قرار

▣ هزینه انجام این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۸۰۱۱ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

گرفته است. مطالعات اسپکترومتری و الکتروفورزی نشان می دهد که مشخصات مولکولی و PH ایزوالکتریک IgY با IgG پستانداران تفاوت دارد(۱۰و۹). به دلیل فاصله فیلوژنتیک پرندگان و پستانداران، آنتی‌بادی علیه پروتئینهای پستانداران در مرغها آسانتر از خرگوشها تولید می‌شود، IgY به کمپلمان پستانداران و رسپتورهای FC متصل نمی شود و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی‌دهد(۱۱). مقدار آنتی‌بادیهایی که از یک مرغ تخم گذار در طی یکسال بدست می‌آید، بیش از ۲۰ گرم است که چندین برابر آنتی‌بادی تولید شده توسط خرگوش در زمان مشابه است(۱۲). برای تایید فعالیت IgY علیه مولکول آنتی‌ژنی خاص نیاز به انجام روشهای ایمونوشیمیایی نظیر ELISA و RIA می‌باشد که بدین منظور آنتی‌بادی علیهIgY مورد نیاز است.

لذا این مطالعه به منظور تهیه و تخلیص آنتی‌بادی علیه IgY از سرم خرگوش انجام گردید، که این فرآورده برای طراحی و راه‌اندازی سیستمهای ایمونوشیمیایی به عنوان معرف آنتی ایمونوگلوبولین کاربرد خواهد داشت.

مواد و روشها

مواد و دستگاهها: سفاروز CL-4B، دی وینیل سولفون، ژل استات سلولز، پانسو S ، ادجوانت کامل و ناکامل فروند، سفادکس G-25، آگاروز، رنگ کوماسی آبی درخشان، ژلاتین، آنتی بادی علیه IgG خرگوش متصل به HRP از شرکتهای مرک، فارماسیا و بیوژن سانتریفوژ(Clements-2000)، PH متر (Suntex)، میکروپلیت‌های ELISA (Nunc)، مش نایلونی، الکتروفورز (الفور) اسپکتروفتومتر (Cecil –1020)UV-Vis

خالص سازی ایمونوگلوبولین Y(IgY) از زرده تخم مرغ

روش اسیدی کردن و کلروفرم: زرده تخم مرغ، مرغ های لاین با عبور از مش نایلونی جدا شده و مراحل زیر به ترتیب انجام گردید.

۱) به ۵ ml زرده ۲۵ ml اسیدکلریدریک ۳ mM افزوده شد (PH با اسید استیک ۱۰٪ به ۵ رسید) و به مدت ۴ ساعت در ۴^{oc} انکوبه شد.

۲) سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. رسوب را دور ریخته و به اندازه حجم مایع رویی ـ با همزدن مداوم ـ کلروفرم افزوده شد. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در۴^{oc}، سانتریفوژ (۳۵۰۰rpm، ۱۵ دقیقه، دمای آزمایشگاه) انجام شد. مایع فوقانی جدا شـده و در مـراحل بعد مـورد استفاده قرار گرفت.

رسوبدهی با سولفات سدیم و کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel) : در دمای آزمایشگاه ۳/۶g سولفات سدیم به ۱۸ml از مایع جدا شده در مرحله قبل افزوده شد. بعد از سانتریفوژ (۳۵۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه) مایع رویی را دور ریخته و رسوب را در ۴ml از بافر TBS (۱۰ mM، pH ۷/۳) دارای NaCl (۰/۱۵ M) و NaN_3 (۰/۰۵٪) حل کرده و ۲ml سولفات سدیم ۳۶٪ به آن افزوده شد. بعد از سانتریفوژ، رسوب در ۲ml TBS (دارای سولفات سدیم ۰/۵ M) حل شد. کروماتوگرافی T-gel بر اساس روش Scops,Scoble (۱۳) با کمی تغییرات انجام شد. ژل تیوفیلیک آماده شده در آزمایشگاه را در ستون با ابعاد ۵×۰/۵۵cm ریخته و حجم نهایی ژل ۱/۶ ml شد. ژل با بافر TBS دارای Na_2SO_4 ۰/۵M به تعادل رسید و جذب نوری محلول خروجی در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد(A۲۸۰). عبور بافر تا۰=A۲۸۰ ادامه یافت. محلول بدست آمده در پایان مرحله رسوبدهی با سولفات سدیم از ستون عبور داده شد و در مراحل بعدی به ترتیب TBS دارای Na_2SO_4 (۰/۵M) و TBS بدون Na_2SO_4 از ستون عبور داده شد و جذب محلول خروجی در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد. الکتروفورز استات سلولز در pH =۸/۶ به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ثابت ۲۴۰ V با سیستم الفور برای تأیید تخلیص ایمونوگلوبین Y انجام شد.

ایمونیزاسیون خرگوشها با ایمونوگلوبولین Y: دو سر خرگوش جوان دوچ حدوداً ۳ ماهه انتخاب گردید. بخشی از موهای پشت حیوان اصلاح شد و ۵۰۰ µg ایمونوژن تهیه شده (IgY) به همراه ادجوانت کامل فروند از طریق زیرپوستی به هر حیوان تزریق شد. بعد از یکماه به هر خرگوش ۲۵۰µg ایمونوژن به همراه ادجوانت ناکامل فروند به طریق عضلانی تزریق گردید. تزریقات بعدی (امولسیون دارای ۲۵۰µg ایمونوژن و ادجوانت ناکامل فروند) در فواصل دو هفته ای به طریق عضلانی انجام شد.

خونگیری و تهیه آنتی سرم: یک هفته بعد از دومین بوستر، خونگیری از رگهای مارژینال (کناری) خرگوش انجام شد. ابتدا با

زایلین رگهای گوش را تحریک کرده تا خون زیادی در این رگها جمع شود سپس با تیغی تیز شکاف عرضی به رگ کناری داده و خون در لوله های شیشه ای تمیز جمع آوری شد. پس از خونگیری خون را به مدت ۱۲ ساعت در ۴^{oc} قرار داده تا سرم از لخته جدا شود. سپس با اپلیکاتور چوبی لخته از دیواره لوله جدا شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی (سرم) را جدا کرده و با افزودن سدیم آزید (۰/۱ ٪) در ۴^{oc} ذخیره شد.

تهیه سرم خرگوش نرمال: از خرگوش نرمال که به آن ایمونوژن تزریق نشده بود، خونگیری شد. پس از سانتریفوژ، سرم جدا شده و با افزودن سدیم آزید (۰/۱٪) در ۲۰^{oc} ذخیره گردید.

تهیه و تخلیص IgG

رسوبدهی با سولفات آمونیوم: ۱/۲g نمک سولفات آمونیوم به ۳ ml /۵ سرم افزوده شد (۴۰٪ اشباع)، ظرف حاوی سرم در حمام یخ و نمک طعام به دمای صفر درجه رسیده و با همزدن متوالی، سولفات آمونیوم به سرم افزوده شد تا حدی که کف تولید نشده و پروتئینها کم کم رسوب کنند. مخلوط حاصله به مدت ۲۰دقیقه در ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شده و رسوب برای آزمایشات بعد نگهداری شد.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-۲۵ : ژل سفادکس G-۲۵ را در ستونی با ابعاد $۱/۱×۲۵^{cm}$ ریخته و حجم نهایی ژل ۲۰ml شد. ژل داخل ستون بابافر PBS (PH =۷/۴) به تعادل رسید و رسوب حاصل از مرحله رسوبدهی بعد از حل شدن در بافر PBS بر روی ستون مذکور قرار داده شد. مایع خروجی از ستون کروماتوگرافی با سرعت جریان حدود ۱۰ml/hr و فراکسیونهای ۱/۵ml جمع آوری شده و جذب نوری آنها در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد.

کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel): از ستون T-gel دارای حدود ۱/۶ml ژل تیوفیلیک استفاده شد. رسوب حاصل از مرحله رسوبدهی با سولفات آمونیوم را در بافر TBS دارای سولفات سدیم ۰/۵M حل کرده و بعد از به تعادل رسیدن ستون با بافر مذکور، از ستون عبور داده شد و در مراحل بعد به ترتیب TBS دارای سولفات سدیم و TBS بدون سولفات سدیم از ستون عبور داده شد و جذب محلول خروجی در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد.

تایید ماهیت مولکولهای خالص شده: الکتروفورز استات سلولز در PH =۸/۶ به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ثابت ۲۴۰V با سیستم الفور انجام شد. برای رنگ آمیزی پروتئینها از محلول رنگی پانسو S استفاده گردید. بعد از رنگ آمیزی، رنگبری و شفاف سازی انجام شد.

تایید فعالیت آنتی بادیهای خالص شده

تهیه ژل ایمونودیفوزیون دوطرفه (DID) : در دو مرحله Pre-coating و Coating انجام شد:

۱)Pre-coating: ۵ ml از محلول ۱ mg/ml آگاروز را روی اسلاید شیشه‌ای (۷۶ mm× ۲۶) قرار داده و به مدت حدود ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد.

۲)Coating: ۵ml از محلول ۱۰mg/ml آگاروز را روی اسلاید دارای ژل اولیه (Pre – Coating) ریخته و در دمای آزمایشگاه خشک شد. چاهکهایی در داخل ژل ایجاد شد که برای نمونه گذاری استفاده گردید.

انجام ایمونودیفوزیون دوطرفه (DID) : در داخل چاهکهای ژل، ایمونوگلوبولین Y در برابر آنتی بادی خرگوش نرمال و آنتی بادی خرگوشهای ایمونیزه شده قرار گرفت و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت خطوط رسوبی مورد بررسی قرار گرفت. خطوط رسوبی با رنگ «آبی درخشان کوماسی» رنگ آمیزی شد.

طراحی ELISA جهت ارزیابی فعالیت آنتی بادی علیه IgY: برای تعیین فعالیت و تیتر آنتی بادی خالص شده علیه IgY مراحل زیر انجام شد:

۱- ۱۰۰µL IgY (۲µg) به دو سری چاهک پلیت میکروتیتر به صورت موازی افزوده شده و به مدت ۱۲ساعت در دمای حدود ۳۰^{oc} انکوبه شد. جهت ارزیابی پیوندهای غیر ویژه (NSB) به دو چاهک، بافر PBS و BSA بطور جداگانه افزوده شده و در شرایط مذکور انکوبه گردید.

۲- پس از شستشو و ضربه زدن (tapping) ۱۵۰µl ژلاتین ۰/۵٪ به عنوان بلوکر به تمام چاهکها اضافه شده و به مدت یکساعت در دمای حدود ۳۰^{oc} قرار گرفت.

۳- IgG خرگوش نرمال (۱۰۰µl) بارقتهای $۱/۱۰^{۱}$ تا $۱/۱۰۰۰۰^{۱}$ به یکسری از چاهکها اضافه شده و در شرایط یکسان به سری دوم

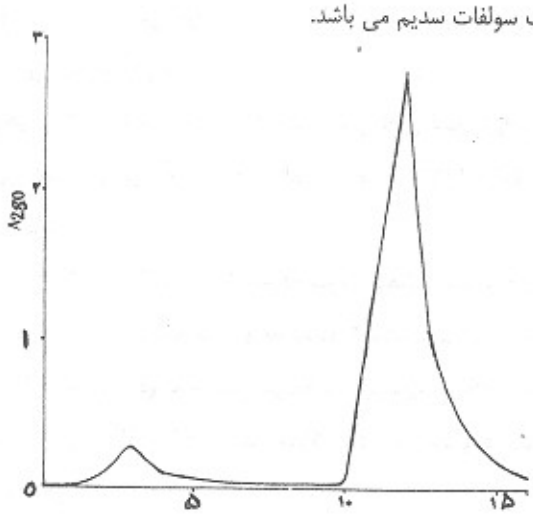
از چاهکها IgG خالص شده از سرم خرگوش ایمونیزه شده، افزوده شد و به مدت یکساعت در دمای ۳۰^{oc} قرار گرفت.

۴- آنتی بادی علیه IgG خرگوش، متصل به آنزیم HRP با رقت ۱/۲۰۰۰ به همه چاهکها افزوده شده و به مدت یکساعت در دمای ۳۰^{oc} انکوبه گردید.

۵- ۱۰۰µl سوبسترای TMB به چاهکها افزوده شده و پس از ۱۰ دقیقه با افزودن ۵۰µl اسیدسولفوریک ۱۲٪ واکنش متوقف و رنگهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. قبل و بعد از مراحل ۳و ۴، شستشو و tapping انجام شد. همچنین بافر PBS با pH =۷/۳ برای شستشو و رقیق سازی مورد استفاده قرار گرفت.

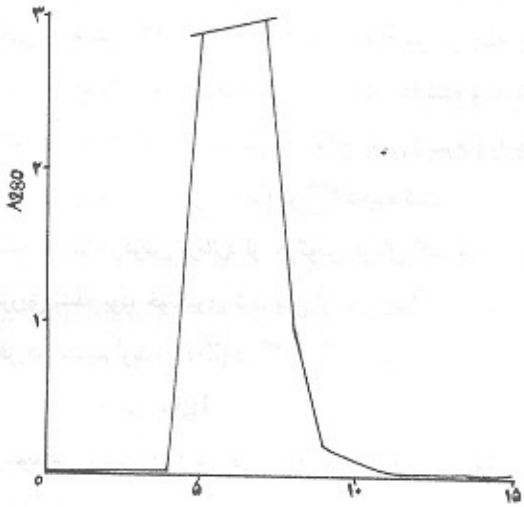
یافته‌ها

کروماتوگرافی تیوفیلیک و تخلیص IgY کروماتوگرافی مربوط به جذب نوری فراکسیونهای خروجی از ستون T-gel در برابر شماره فراکسیونها در شکل۱ رسم شده است . پیک اول مربوط به فراکسیونهای خروجی همراه بافر TBS دارای نمک سولفات سدیم و پیک دوم مربوط به فراکسیونهای خروجی همراه بافر TBS بدون نمک سولفات سدیم می باشد.



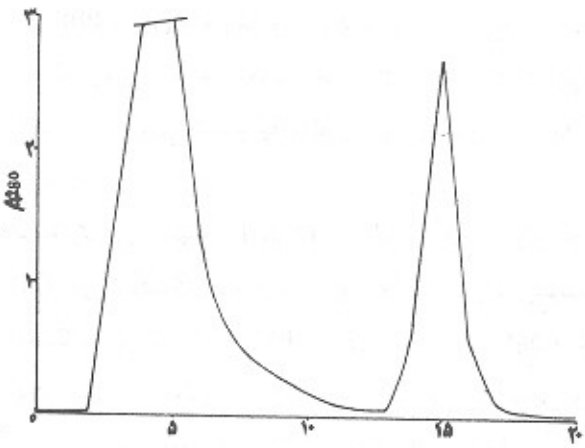
شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون کروماتوگرافی T-gel (تخلیص IgY): جذب نوری در طول موج ۲۸۰nm خوانده شد و هر فراکسیون ۱/۵ml حجم دارد.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-۲۵ شکل ۲، کروماتوگرام مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون سفادکس G-۲۵ مربوط به سرم خرگوش نرمال می باشد. کروماتوگرامهای مربوط به خرگوشهای ایمونیزه شده الگوی مشابهی داشت.



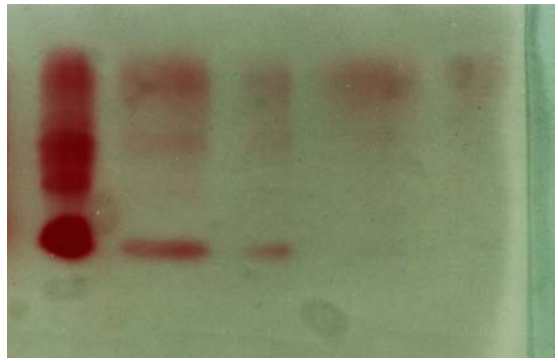
شکل ۲. کروماتوگرام مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون سفادکس G-25 جهت تخلیص IgG از سرم خرگوش نرمال

کروماتوگرافی تیوفیلیک و تخلیص آنتی IgY در شکل۳، کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی T-gel برای خالص سازی آنتی بادیهای خرگوش علیه IgY نشان داده شده است . در پیک اول ناخالصی ها و در پیک دوم آنتی بادیها ظاهر شده اند.



شکل ۳. جذب نوری در ۲۸۰nm در برابر شماره فراکسیونهای خروجی از ستون کروماتوگرافی T-gel: در پیک دوم آنتی بادی علیه IgY مشاهده شد.

الکتروفورز استات سلولز: در شکل۴، نتیجه الکتروفورز استات سلولز سرم خرگوش، محصول کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و محصول کروماتوگرافی T-gel نشان داده شده است.



شکل ۴. الکتروفورزاستات سلولز سرم خرگوش (۱)، محصولات کروماتوگرافی سفادکس G-25: (۳و۲) و محصولات کروماتوگرافی T-gel (۶و۵)

ایمونودیفوزیون دو طرفه (DID): شکل ۵، نشانگر ایمونودیفوزیون دو طرفه است که در آن IgY واقع در چاهک مرکزی در برابر آنتی بادی خرگوش نرمال واکنش نداده ولی آنتی بادیهای خالص شده از خرگوشهای ایمونیزه با IgY واکنش داده و خط رسوبی بعد از رنگ آمیزی مشاهده می شد.

شکل ۵. ایمونودیفوزیون دو طرفه (DID) بعد از رنگ آمیزی با کوماس آبی درخشان: چاهک مرکزی دارای IgY، چاهکهای پایین و بالا بترتیب دارای آنتی بادی سرم خرگوش نرمال وآنتی بادی سرم خرگوش ایمونیزه باشند.

ELISA جهت ارزیابی فعالیت آنتی بادی علیه IgY : رنگ زرد تولید شده در پایان آزمایش تشکیل کمپلکس آنتی بادی و پاسخ مثبت را نشان داد. نتایج نشانگر فعالیت آنتی بادی علیه IgY تا رقت ۱/۱۰۰۰۰ می باشد. در چاهکهای دارای رقتهای ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰۰ از آنتی بادی علیه IgY به ترتیب بیشترین و کمترین تغییر رنگ مشاهده گردید. در چاهکهای دارای آنتی بادی خرگوش نرمال، بافر PBS و پروتئین BSA تغییر رنگ مشاهده نگردید.

بحث

ایمونوگلوبولین زرده تخم مرغ با ساختمان مولکولی و مشخصات منحصر به فرد می تواند به عنوان جایگزین آنتی بادیهای پلی کلونال موجود در بسیاری از روشهای ایمونوشیمیایی و نیز ایمونوتراپی استفاده شود. تولید آنتی بادی علیه IgY برای شناسایی و تعیین فعالیت IgY و نیز طراحی کیت های ایمونوشیمیایی ضروری است. در این تحقیق با استفاده از تجهیزات ارزان و هزینه کم IgY از زرده تخم مرغ جدا شده و با استفاده از کروماتوگرافی تیوفیلیک خالص گردید. تزریق های اولیه و بوستر IgY به همراه ادجوانت فروند به خرگوش منجر به تولید آنتی بادی علیه IgY شد که با استفاده از روشهای رسوبدهی اولیه و بعد کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون خالص گردید. وجود بیش از یک باند در الکتروفورز استات سلولز نشانگر ناخالصی در محصول نهایی می باشد. پس از کروماتوگرافی T-gel، الکتروفورز استات سلولز نشانگر محصول خالص می باشد که در باند گاما الکتروفورزی مشاهده گردید. تخلیص آنتی بادیهای انسان نیز با روش T-gel توسط ما و سایر محققین گزارش شده است(۱۴). در این تحقیق آنتی بادی از سرم خرگوش به روش T-gel جدا شده و فعالیت آن تأیید گردید. روش ایمونودیفوزیون دو طرفه (DID) در این تحقیق راه اندازی شد که می توان از آن برای شناسایی و تعیین فعالیت آنتی بادیها استفاده نمود و بعد از رنگ آمیزی با کوماسی آبی درخشان، مورد مطالعه قرار داد. نتایج ایمونودیفوزیون دو طرفه نشانگر خط رسوبی در حد فاصل چاهکهائی مربوط به IgY و آنتی IgY می‌باشد که این خطوط در حد فاصل چاهک های IgY و آنتی‌بادی خرگوش نرمال مشاهده نگردید، لذا واکنش آنتی بادی تولید شده بر علیه IgY زرده

تخم مرغ تأیید گردید. فعالیت آنتی بادی علیه IgY با روش ELISA نیز تأیید گردید، بطوریکه تا رقت ۱/۱۰۰۰۰ نیز فعالیت آنتی بادی مشاهده شد. با نشاندار کردن آنتی بادی علیه IgY می توان انواع روشهایELISA برای تعیین فعالیت و نیز اندازه گیری مولکولهای مختلف را طراحی و راه اندازی نمود. تهیه و تخلیص آنتی بادی علیه IgY از خرگوش به دلیل فاصله فیلوژنتیک پرندگان و پستانداران می تواند منجر به افزایش کارآیی روشهای ایمونواسی و نیز کاهش خطای مثبت در این روشها گردد. با نگاهی به IgY و آنتی IgY در آینده ای نزدیک شاهد طراحی روشهای جدید ایمونواسی و ایمونوتراپی با هزینه کمتر و کارآیی بیشتر خواهیم بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از شورای محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل بدلیل حمایت مالی و نیز از آقایان محمدعلی پاشائی، حسین رجبی و عزیز شیرافکن که در مراحل اجرای این طرح همکاری نمودند، قدردانی می شود.

****

References

1. 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. Preparative Biochem Biotechnol 1997; 27(4): 227-37.

2. Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Brouillet JP. High affinity antibodies from hen's – egg yolk against human mannose – 6- phosphate/ 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.

3. 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.

4. Smith DJ, King WF, Godisha R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to streptococcus mutans glucan binding protein B can confer protection against experimental dental carries. Infect Immunol 2001; 69(5): 3135-42.

5. Uang J, Jin Z, Yau 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.

6. Broderson JR. A retrospective review of lesions associated with the use of freund's adjuvant. Lab Animal Sci 1989; 39: 400-5.

7. 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.

8. Akita EM, Li- Vhan ECY, Nakai S. Neutralization of enterotoxigenic escherichia coli heat- labil toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen binding fragments. Food Agricul Immunol 1998; 10(2): 161-72.

9. Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Common Mass spectrom 2001; 15(9): 708-12.

10. Warr CW, Magor KE, Higgins DA. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today 1995; 16(8): 392-8.

11. Larrsson A, Sjoequist J. Chicken IgY: Utilizing the evolutionary difference. Comp Immunol Microbial Infect Dis 1990; 13(4): 199-201.

12. Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification . J Food Sci 1992; 57(3): 629-34.

13. Scoble JA, Scopes PK. Ligand structure of the divinylsulfone – based T-Gel. J Chromatogr A 1997; 787:47-54.

۱٤. پورامیر م، اسدالهی ص، پاک نژاد ب.خالص سازی ایمونوگلوبولین سرم انسان با روش کروماتوگرافی T-gel. مجله علمی _ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۱۳۸۱: ٤(۳):۱۷ – ۱۲.

* آدرس نویسنده مسئول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، گروه بیوشیمی ـ بیوفیزیک، تلفن: ۲۲۳٤٦۸٦-۰۱۱۱.