

تهیه و تخلیص آنتی بادی آنتی ایمونوگلوبولین Y از خرگوش

دکتر مهدی پورامیر^{۱*}، دکتر سلیمان محبوب^۱، دکتر قربان ملیجی^۲

۱- استادیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- استادیار گروه میکروبیولوژی - 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 می کنند. 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، تزریقاتی 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 ایمونودیفرانسیون دو طرفه و ELISA برای تأیید ماهیت و فعالیت آنتی بادی علیه IgY استفاده شد.

یافته ها: 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 ایمونودیفرانسیون دو طرفه علیه IgY واکنش داده و تیتراژ آنتی بادی در ELISA یک ده هزارم بدست آمد.

نتیجه گیری: این آنتی بادیها می توانند در سنجشهای ایمنی برای شناسایی و سنجش انواع مولکولها به عنوان معرف آنتی ایمونوگلوبولین Y کاربرد داشته باشند.

واژه های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، آنتی بادی آنتی IgY، خرگوش، خالص سازی.

مقدمه

آنتی بادیهای زرده تخم مرغ (IgY)، مرغهای ایمونیزه شده کاربردهای تشخیصی و درمانی دارند. IgY فعال در طراحی انواع روشهای ایمونوشیمیایی مانند تکنیکهای ELISA، وسترن بلاتینگ (۱و۲) و نیز در ایمونوتراپی برای پیشگیری و درمان عفونتهای روده ای (۳)، ایمونیزاسیون غیرفعال برای پیشگیری و درمان پوسیدگی

دندان (۴)، به عنوان حامل داروهای ضدسرطانی (۵)، به عنوان پادزهر (Antidote) در مسمومیتها با سموم (۶) و نیز IgY علیه گونه های 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.

حجم مایع رویی - با همزدن مداوم - کلروفرم افزوده شد. پس از ۱۲ ساعت انکوباسیون در 4°C ، سانتریفوژ (۳۵۰۰ rpm، ۱۵ دقیقه، دمای آزمایشگاه) انجام شد. مایع فوقانی جدا شده و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

رسوبدهی با سولفات سدیم و کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel): در دمای آزمایشگاه $3/6^{\circ}\text{C}$ سولفات سدیم به ۱۸ ml 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 ۴ ml بافر TBS (10 mM ، $\text{pH } 7/3$) دارای NaCl ($0/15\text{ M}$) و NaN_3 ($0/05\%$) حل کرده و ۲ ml سولفات سدیم $3/6\%$ به آن افزوده شد. بعد از سانتریفوژ، رسوب در ۲ ml TBS (دارای سولفات سدیم $0/5\text{ M}$) حل شد. کروماتوگرافی T-gel بر اساس روش Scopes, Scoble (۱۳) با کمی تغییرات انجام شد. ژل تیوفیلیک آماده شده در آزمایشگاه را در ستون با ابعاد $5 \times 0/55\text{ cm}$ ریخته و حجم نهایی ژل ۱/۶ ml شد. ژل با بافر TBS دارای Na_2SO_4 ($0/5\text{ M}$) به تعادل رسیده و جذب نوری محلول خروجی در طول موج 280 nm خوانده شد (A_{280}). عبور بافر تا $A_{280}=0$ 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 ($0/5\text{ M}$) و TBS بدون Na_2SO_4 از ستون عبور داده شد و جذب محلول خروجی در طول موج 280 nm خوانده شد. الکتروفورز اسلات سلولز در $\text{pH } 8/6$ به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ثابت ۲۴۰ V با سیستم الفور برای تأیید تخلیص ایمونوگلوبولین Y انجام شد.

ایمونیزاسیون خرگوشها با ایمونوگلوبولین Y: دو سر خرگوش جوان دوج حدوداً ۳ ماهه انتخاب گردید. بخشی از موهای پشت حیوان اصلاح شد و $500\text{ }\mu\text{g}$ ایمونوژن تهیه شده (IgY) به همراه ادجوانت کامل فروند از طریق زیرپوستی به هر حیوان تزریق شد. بعد از یکماه به هر خرگوش $250\text{ }\mu\text{g}$ ایمونوژن به همراه ادجوانت ناکامل فروند به طریق عضلانی تزریق گردید. تزریقات بعدی (امولسیون دارای $250\text{ }\mu\text{g}$ 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

گرفته است. مطالعات اسپکترومتری و الکتروفورزی نشان می دهد که مشخصات مولکولی و pH ایزوالکتریک IgY با IgG پستانداران تفاوت دارد (۹۱۰). به دلیل فاصله فیلوژنتیک پرندگان و پستانداران، آنتیبادی علیه پروتئینهای پستانداران در مرغها آسانتر از خرگوشها تولید می شود، IgY به کمپلمان پستانداران و رسپتورهای FC متصل نمی شود و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی دهد (۱۱). مقدار آنتیبادیهایی که از یک مرغ تخم گذار در طی یکسال بدست می آید، بیش از ۲۰ گرم است که چندین برابر آنتیبادی تولید شده توسط خرگوش در زمان مشابه است (۱۲). برای تأیید فعالیت IgY علیه مولکول آنتیژنی خاص نیاز به انجام روشهای ایمونوشیمیایی نظیر ELISA و RIA می باشد که بدین منظور آنتیبادی علیه IgY 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 راه اندازی سیستمهای ایمونوشیمیایی به عنوان معرف آنتی ایمونوگلوبولین کاربرد خواهد داشت.

مواد و روشها

مواد و دستگاهها: سفارز CL-4B، دی وینیل سولفون، ژل اسلات 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)، میکروپلیت های ELISA (Nunc)، مش نایلونی، الکتروفورز (الفور) اسپکتروفتومتر UV-Vis (Cecil-1020)

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 3 mM افزوده شد (pH با اسید استیک 10% به ۵ رسید) و به مدت ۴ ساعت در 4°C انکوبه شد.

(۲) سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در 3500 rpm سانتریفوژ شد. رسوب را دور ریخته و به اندازه

تایید ماهیت مولکولهای خالص شده: الکتروفورز استات سلولز در PH=۸/۶ به مدت ۴۰ دقیقه و با ولتاژ ثابت ۲۴۰۷ 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 (۷۶×۲۶) 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 تیتراژ آنتی بادی خالص شده علیه IgY مراحل زیر انجام شد:

۱- ۱۰۰µL IgY (۲µg) به دو سری چاهک پلیت میکروتیترا به صورت موازی افزوده شده و به مدت ۱۲ ساعت در دمای حدود ۳۰°C 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°C قرار گرفت.

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

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°C 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°C 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°C ذخیره گردید.

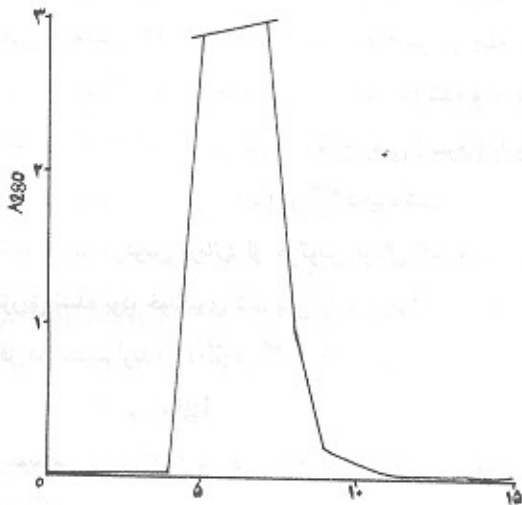
تهیه و تخلیص IgG

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 ۲۰ دقیقه 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 بافر 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.

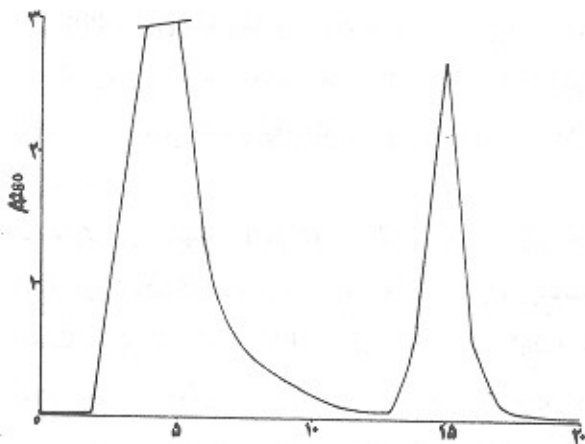
کروماتوگرافی تیوفیلیک (T-gel): از ستون T-gel دارای حدود ۱/۶ml ژل تیوفیلیک استفاده شد. رسوب حاصل از مرحله رسوبدهی با سولفات آمونیوم را در بافر TBS دارای سولفات سدیم ۰/۵M حل کرده و بعد از به تعادل رسیدن ستون با بافر مذکور، از ستون عبور داده شد و در مراحل بعد به ترتیب TBS دارای سولفات سدیم و TBS بدون سولفات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

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

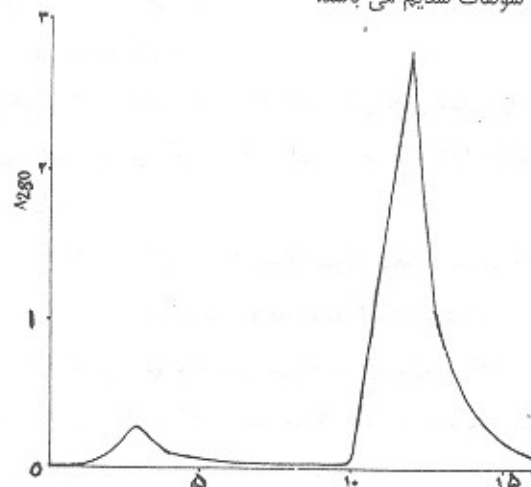
از چاهکها IgG خالص شده از سرم خرگوش ایمونیزه شده، افزوده شد و به مدت یکساعت در دمای ۳۰°C قرار گرفت.

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°C انکوبه گردید.

۵- ۱۰۰ μl سوسترای TMB به چاهکها افزوده شده و پس از ۱۰ دقیقه با افزودن ۵۰ μl اسیدسولفوریک ۱۲٪ واکنش متوقف و رنگهای ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت. قبل و بعد از مراحل ۳ و ۴، شستشو و tapping انجام شد. همچنین بافر PBS با pH=۷/۲ برای شستشو و رقیق سازی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها

کروماتوگرافی تیوفیلیک و تخلیص IgY کروماتوگرافی مربوط به جذب نوری فراکسیونهای خروجی از ستون T-gel در برابر شماره فراکسیونها در شکل ۱ 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 ۲۸۰ nm خوانده شد و هر فراکسیون ۱/۵ ml حجم دارد.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با سفادکس G-۲۵. شکل ۲، کروماتوگرام مربوط به فراکسیونهای خروجی از ستون سفادکس

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 $1/1000$ می باشد. در چاهکهای دارای رقتهای $1/100$ و $1/1000$ 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 بادهای 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 بادهای 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 ایمونودیفیوژین دو طرفه (DID) در این تحقیق راه اندازی شد که می توان از آن برای شناسایی و تعیین فعالیت آنتی بادهای استفاده نمود و بعد از رنگ آمیزی با کوماسی آبی درخشان، مورد مطالعه قرار داد. نتایج ایمونودیفیوژین دو طرفه نشانگر خط رسوبی در حد فاصل چاهکهای مربوط به IgY و آنتی IgY می باشد که این خطوط در حد فاصل چاهک های IgY و آنتی بادی خرگوش نرمال مشاهده نگردید، لذا واکنش آنتی بادی تولید شده بر علیه IgY زرده

الکتروفورز استات سلولز: در شکل ۴، نتیجه الکتروفورز استات سلولز سرم خرگوش، محصول کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون و محصول کروماتوگرافی T-gel نشان داده شده است.



شکل ۴. الکتروفورز استات سلولز سرم خرگوش (۱)، محصولات کروماتوگرافی سفادکس G-25: (۲ و ۳) و محصولات کروماتوگرافی T-gel (۵ و ۶)

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



شکل ۵. ایمونودیفیوژین 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 و آنتی بادی سرم خرگوش ایمونیزه باشند.

آنتی IgY در آینده ای نزدیک شاهد طراحی روشهای جدید ایمونواسی و ایمونوتراپی با هزینه کمتر و کارایی 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.

تخم مرغ تأیید گردید. فعالیت آنتی بادی علیه IgY با روش ELISA نیز تأیید گردید، بطوریکه تا رقت ۱/۸۰۰۰۰ نیز فعالیت آنتی بادی مشاهده شد. با نشاندار کردن آنتی بادی علیه IgY می توان انواع روشهای ELISA 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 کارایی روشهای ایمونواسی و نیز کاهش خطای مثبت در این روشها گردد. با نگاهی به IgY و

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. Larsson A, Sjöquist 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.

۱۴. 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: ۴(۳): ۱۷- ۱۲.