● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم ، شمارهٔ ۲ (پی‌درپی ۱۰) ، صفحه ۷ الی ۱۱ ، بهار ۱۳۸۰

خالص سازی ایمونوگلوبولین Y از زرده تخم مرغ با روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

دکتر مهدی پورامیر ،[۱*] دکتر محمدجواد رسائی [۲]

۱- استادیار گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی بابل ۲- دانشیار گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

سابقه و هدف : خالص سازی ایمونوگلوبین Y از زرده تخم‌مرغ با روش‌های کروماتوگرافی از تحقیقات جدید می‌باشد و هدف این تحقیق نیز دستیابی به روش ساده و ارزان برای خالص سازی IgY از زرده تخم مرغ می‌باشد.

مواد و روشها: زرده تخم مرغ بعد از عبور از مش نایلونی در داخل استوانه مدرج جمع‌آوری شد. زرده با ۱۰ برابر حجم HCL(۳mM) رقیق شده وسوسپانسیون سانتریفوژ گردید. سولفات‌آمونیوم تا ۶۰٪ اشباع اضافه شده ورسوب حاصله در بافر فسفات حل و روی ستونهای کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-25 و G-200 قرار گرفت.

یافته‌ها: الکتروفورز استات سلولز در pH=9 نشانگر باندهای اضافی است که بعد از رسوبدهی با سولفات‌آمونیوم و کروماتوگرافی سفادکس G-25 جداشده‌است. باند خالص شده‌درناحیه گاماگلوبولین مشاهده شد. بعداز کروماتوگرافی سفادکس G-200، الکتروفورز SDS-PAGE محصول‌نهایی‌نشانگر یک‌باند‌اصلی‌درناحیه وزن مولکولی حدود ۶۲KD بود.

نتیجه گیری: استخراج و خالص سازی IgY از زرده تخم‌مرغ، با اسید، سانتریفوژ، سولفات آمونیوم و ژل فیلتراسیون روشی کاربردی وساده است.

واژه‌های کلیدی: *ایمونوگلوبولین Y، ژل فیلتراسیون، خالص‌سازی.*

مقدمه

آنتی‌بادیهای موجود در زرده تخم‌مرغ، IgY (Yolk Immunoglobulin) نامیده می‌شود که وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک آن با IgG پستانداران تفاوت دارد (۳-۱). IgY نقش پیشرونده‌ای بعنوان جایگزین آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال پستانداران ایفا می‌کند. اخیراً از IgY در تحقیقات بیوشیمیایی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها استفاده شده است (۶-۴). فاصله فیلوژنتیک بین پرندگان و پستانداران، زیاد است و آنتی‌بادی در برابر پروتئینهای پستانداران در پرندگان آسانتر از خرگوش تولید می‌شود(۱). IgY از خون به زرده منتقل شده و می‌توان آنرا بدون استفاده از روشهای تهاجمی مانند خونگیری روزانه جمع‌آوری کرده و در ۴درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری کرد. گزارشها بیانگر آن است که در مقایسه با خرگوش، مقدار خیلی بیشتری آنتی‌بادی ویژه را می‌توان از زرده تخم‌مرغهای ایمونیزه شده بدست آورد (۷). IgY به

▣ - هزینهٔ این پژوهش در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۱۳۷۸۲۲ از اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بابل تأمین شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.1.2]

کمپلمان و رسپتور FC پستانداران متصل نشده و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی‌دهد (۸).

بدلیل وجود مقدار زیادی لیپید در زرده تخم‌مرغ و عدم اتصال پروتئین A استافیلوکوکی و پروتئین G استرپتوکوکی به IgY، تخلیص IgY از زرده تخم‌مرغ با روشهای معمولی طراحی شده برای تخلیص IgG، دشوار است (۱). چند روش برای جداسازی و تخلیص IgY گزارش شده است (۱۴-۹). اولین مرحله در خالص‌سازی IgY جدا کردن لیپیدها و استخراج پروتئین‌های فاز آبی است و بعد رسوبدهی با سولفات سدیم، سولفات آمونیوم یا پلی‌اتیلن گلیکول پیشنهاد شده است. آخرین مرحله استفاده از روش کروماتوگرافی نظیر مبادله یونی، ژل فیلتراسیون، هیدروفوبیک یا تیوفیلیک است (۱۳-۹).

در این مطالعه از روش‌های اسیدی کردن، سانتریفوژ، رسوبدهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون برای استخراج و خالص سازی IgY از زرده تخم‌مرغ استفاده شده‌است.

مواد و روشها

مواد: مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل: سفادکس G-25، سفادکس G-200، ژل استات سلولز، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، سدیم‌دودسیل سولفات (SDS)، N,N,N,N ـ تترامتیل‌اتیلن دی‌آمین (TEMED)، استاندارد وزن مولکولی پروتئین‌ها، ۲ـ مرکاپتواتانول (2ME)، بروموفنل‌بلو (BPB)، سولفات‌آمونیوم، محلول رنگی کوماسی برلیان‌بلو، محلول رنگی پانسو S از شرکتهای سیگما، فارماسیا ومرک می‌باشد.

۱- ***جداسازی پروتئین‌ها از لیپیدهای زرده:*** از یک تخم‌مرغ «های لاین» (اهدائی از مرغداری ابوالقاسم پور ساری) ۱۳ml زرده بعد از عبور از مش نایلونی جدا شده و مقدار پروتئین آن به روش بیوره Biuret اندازه‌گیری شد (۱۵). به ۱۰ml زرده، ۱۰۰ml اسید کلریدریک ۳mM افزوده شد (PH با اسید استیک ۱۰٪ به ۵ رسید) و به مدت ۶ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در ۳۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب را دور ریخته وفاز مایع در ظرف جداگانه‌ای نگهداری شد.

۲- ***خالص سازی IgY با روش رسوبدهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون:*** در ادامه آزمایش به ۵۰ml از مایع رویی، ۱۸/۳g سولفات‌آمونیوم (۶۰٪ اشباع) در دمای صفر درجه سانتیگراد با همزدن مداوم افزوده شد و بعد از سانتریفوژ (۳۵۰۰rpm بمدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه) رسوب در بافر فسفات (۵۰mM، PH= ۷/۴) حل شده و ۲/۴ml از محلول، روی ستون کروماتوگرافی سفادکس G-25 با ابعاد ۱/۱×۲۵cm قرار داده شد و با سرعت جریان ۶ml/hr کروماتوگرافی با افزودن بافر فسفات انجام شد. فراکسیونهای خروجی جمع‌آوری شده و با اندازه‌گیری جذب نوری در ۲۸۰nm (A280) در دستگاه اسپکتروفتومتر Cecil 1000/uv-vis، منحنی کروماتوگرافی رسم گردید. فراکسیونهای با جذب بیش از یک (۶ml) مخلوط شده و درون ستون سفادکس G-200 با ابعاد ۱/۱×۵۰cm و سرعت جریان خروجی ۶ml/hr قرار گرفت. با افزودن بافر فسفات، جریان مایع برقرار شد. فراکسیونهای خروجی جمع‌آوری شده و جذب نوری آنها در ۲۸۰nm اندازه‌گیری شد و منحنی کروماتوگرام G-200 رسم گردید.

۳- ***تأیید مراحل خالص‌سازی IgY*** : الکتروفورز استات سلولز در PH=۹ به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۲۴۰V در سیستم «الفور» انجام شد و برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها از پانسو S استفاده گردید. بعد از رنگبری و شفاف سازی، ژل به روی شیشه‌ای منتقل شده که در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به طلق شفاف قابل نگهداری در دمای آزمایشگاه تبدیل شد.

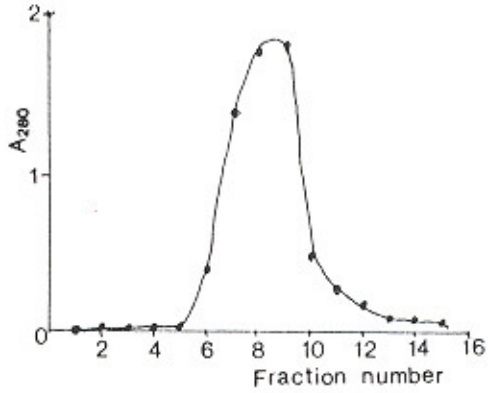
الکتروفورز SDS-PAGE به روش Laemmli انجام شد (۱۶) که در آن از ژل متراکم کننده ۴٪، ژل جداکننده ۶٪ و استاندارد وزن مولکولی ۳۶-۲۰۵KD (Sigma marker)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.1.2]

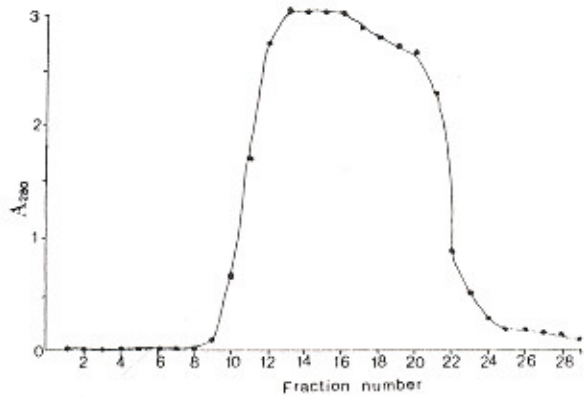
استفاده شد و با رسم نمودار لگاریتم وزن مولکولی در برابر فاصله طی شده به سانتیمتر، وزن مولکولی پروتئین مجهول محاسبه گردید.

یافته‌ها

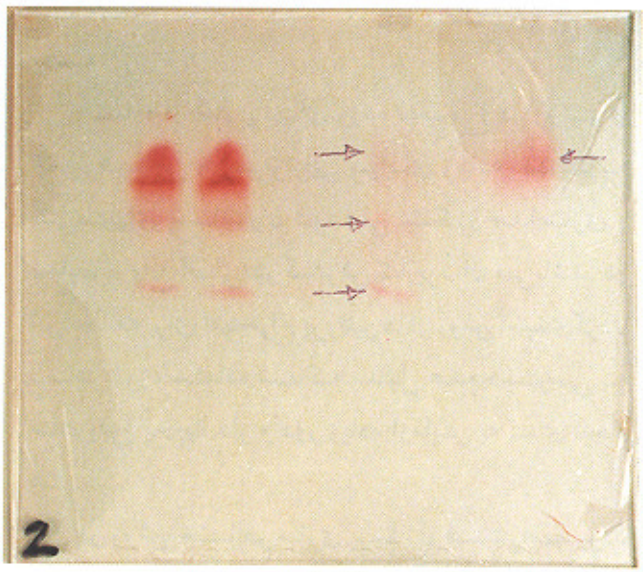
غلظت پروتئین در زرده تخم‌مرغ ۱۹g/dl اندازه‌گیری شد. کروماتوگرام‌های ژل فیلتراسیون سفادکس G-25 و G-200 نشانداده شده است (شکل ۱و۲). الکتروفورز استات سلولز بعد از فیلتراسیون G-25 نشانگر وجود سه باند پروتئینی مجزا می‌باشد که بعد از کروماتوگرافی G-200 فقط یک‌باند درناحیه گاما الکتروفورزی باقی ماند.



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به نمونه بعد از رسوبدهی انتخابی با سولفات آمونیوم، که از ستون کروماتوگرافی‌دارای ژل سفادکس G-25 عبورداده‌شده و در فراکسیونهای ۲ml جمع‌آوری و A_{280} خوانده شده است.



شکل۲. کروماتوگرام G-200مربوط به مخلوط فراکسیونهای خروجی از ستون سفادکس G-25 که دارای $A_{280} > 1$ می‌باشند و از ستون سفادکس G-200 عبور داده شده است.



شکل ۳. الکتروفورز استات سلولز که نشانگر مراحل خالص سازی در روش استفاده‌از ژل فیلتراسیون می‌باشد: نمونه زرده‌رقیق شده با TBS(II,I) مخلوط فراکسیونها بعد از کروماتوگرافی G-25(III) و مخلوط فراکسیونها بعد از کروماتوگرافی G-200(IV)

مخلوط فراکسیونهای خروجی مربوط به پیک کروماتوگرافی G-200 در SDS-PAGE بیش‌از یک باند را نشان داد ولی باند اصلی در ناحیه وزن مولکولی حدود ۶۳KD مشاهده شد که مربوط به زنجیره سنگین (H) ایمونوگلوبولین Y می‌باشد (شکل۴).



شکل۴. الکتروفورز SDS-PAGE مخلوط فراکسیونهای خروجی کروماتوگرافی G-200(I) واستاندارد وزن‌مولکولی پروتئین‌ها(II)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.1.2]

بحث

استفاده از آنتی‌بادیهای زرده تخم‌مرغ در روشهای ایمونوشیمیایی و ایمونوتراپی مزایای زیادی نسبت به آنتی‌بادیهای پستانداران دارد ولی مشکل جداسازی و تخلیص، مانع اصلی در گسترش کاربرد آن می‌باشد. در این مطالعه برای استخراج پروتئین‌ها از روش اسیدی‌کردن ـ سانتریفوژ،استفاده شد که بدلیل عدم دسترسی به سانتریفوژ یخچال‌دار و دور زیاد، آزمایش به کندی انجام شد.

در روش خالص‌سازی با ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی سفادکس G-25 برای نمک‌زدایی بکار رفت، تا نمکهای باقیمانده از مرحله رسوبدهی با سولفات آمونیوم تا حد امکان کاهش یابد. بعد از کروماتوگرافی G-25 سه باند مجزا در الکتروفورز استات سلولز مشاهده شد که غیر از باند ناحیه گاما سایر باندها نشانگر وجود پروتئین‌های ناخالص می‌باشد (شکل ۳). بعد از کروماتوگرافی G-200 تنها یک باند در ناحیه گاما باقی‌ماند که دارای IgY است. در الکتروفورز SDS-PAGE یک باند اصلی مشاهده شد که بیانگر خالص‌سازی در طی ژل فیلتراسیون می‌باشد زیرا پروتئین موجود در ناحیه وزن مولکولی حدود ۶۳KD (زنجیر H ایمونوگلوبولین Y) خیلی بیشتر از پروتئین‌های ناخالص است در سایر تحقیقات (۱۰و۹و۱) بعد از SDS-PAGE با رنگ‌آمیزی «کوماسی» زنجیر IgY (H) و با رنگ‌آمیزی حساس‌تر «نیترات نقره» یا «ایمونوبلات» زنجیر سبک IgY(L) نیز نشان داده شده است که این زنجیر با رنگ‌آمیزی کوماسی ظاهر نمی‌شود. وجود پروتئین‌های ناخالص ممکن است به دلیل حجم و ارتفاع کم ستون کروماتوگرافی باشد ولی با افزایش حجم ژل، زمان انجام کروماتوگرافی و تخلیص نیز افزایش می‌یابد.

با توجه به نتایج این تحقیق که استخراج پروتئین‌های زرده با روش اسیدی کردن ـ سانتریفوژ و خالص‌سازی IgY با روشهای رسوبدهی انتخابی و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-25 و سفادکس G-200 برای جداسازی و تخلیص IgY در شرایط آزمایشگاه ما انجام‌پذیر است و نیاز به دستگاههای پیچیده و هزینه زیاد ندارد. از محصولات تخلیص می‌توان در روشهای ایمونواسی برای اندازه‌گیری مولکولها در مایعات بیولوژیک استفاده کرد ولی کاربرد آن در ایمونوتراپی نیاز به خالص‌سازی بیشتر و انجام آزمایشهای تکمیلی دارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری و مساعدت شورای محترم پژوهشی به جهت تصویب و تامین اعتبار طرح همچنین از آقایان دکتر علی‌اکبر مقدم‌نیا، دکتر دردی قوجق، دکتر علیرضا فیروزجائی و دکتر رستگار سپاسگزاری می‌شود.

****

References

1. Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NG. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol methods 1998; 215: 1-7.

2. Johnstone A, Thorpe R. Immunochemistry in practice. Black well science. 3rd ed 1996; PP: 66-8.

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

4. Camenish G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, et al. General applicability of chicken egg yolk antibodies:the

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.1.2]

performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-induced fator falpha. FASEB J 1999; 13 (1): 81-8.

5. Fortgens PH, Dennison C, Elliott E. Anti-catapsin 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.

6. Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Broullet JP. High affinity antibodies from hen's egg yolks against human mannose 6 phosphate insulin like growth factor II receptor (M6P/IGF II-R) characterization and potential use in clinical cancer studies. Int J Cancer 1999; 80(6): 896-902.

7. Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Egg conveniently packaged antibodies . Methods for purification of yolk IgG. J Immunol Methods 1981; 46: 63-8.

8. Larsoon A, Karlsson -parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassay to avoid interference by rheumatoid factors. Clin Chem 1991; 37(3): 411-14.

9. Ntakarutimana V, Demedts P, Van Sande M. A simple and echonomical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. J Immunol Methods 1992; 153: 133-40.

10. Hassel A, Aspock H. Purification of egg yolk immunoglobuilns a two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filteration. J Immunol Methods 1988; 110: 225-8.

11. Polson A. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. Immunol Invest 1990; 19(3): 253-8.

12. 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.

13. Porath J, Maisano F, Belew M. Thiophilic adsorption - a new method for protein fractionation. FEBS Lett 1985; 185(2): 306 -10.

14. Scoble JA, Scopes RK. Ligand structure of the divinylsulfone -based T- gel. J Chromatogr A 1997; 787: 47-54.

15. Tietz NW. Textbook of clinical chemistry W.B. Saunders company 1985; 582-3.

16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriphage T4. Nature 1970; 227: 680-5.

* آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی بابل، گروه بیوشیمی-بیوفیزیک، تلفن: ۵-۲۲۲۹۵۹۱-۰۱۱۱ .

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.1.2]