

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

دکتر مهدی پورامیر<sup>۱\*</sup>، دکتر محمدجواد رسائی<sup>۲</sup>

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

**سابقه و هدف:** خالص سازی ایمونوگلوبولین Y از زرده تخم مرغ با روش های کروماتوگرافی از تحقیقات جدید می باشد و هدف این تحقیق نیز دستیابی به روش ساده و ارزان برای خالص سازی IgY از زرده تخم مرغ می باشد. **مواد و روشها:** زرده تخم مرغ بعد از عبور از مش نایلونی در داخل استوانه مدرج جمع آوری شد. زرده با ۱۰ برابر حجم HCL (۲mm) رقیق شده و سوسپانسیون سانتیفریوژ گردید. سولفات آمونیوم تا ۶۰٪ اشباع اضافه شده و رسوب حاصله در بافر فسفات حل و روی ستونهای کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون سفادکس G-25 و G-200 قرار گرفت. **یافته ها:** الکتروفورز استات سلولز در pH=9 نشانگر باندهای اضافی است که بعد از رسوبدهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی سفادکس G-25 جدا شده است. باند خالص شده در ناحیه گاماگلوبولین مشاهده شد. بعد از کروماتوگرافی سفادکس G-200، الکتروفورز SDS-PAGE محصول نهایی نشانگر یک بانداصلی در ناحیه وزن مولکولی حدود ۶۲KD بود. **نتیجه گیری:** استخراج و خالص سازی IgY از زرده تخم مرغ، با اسید، سانتیفریوژ، سولفات آمونیوم و ژل فیلتراسیون روشی کاربردی و ساده است. **واژه های کلیدی:** ایمونوگلوبولین Y، ژل فیلتراسیون، خالص سازی.

### مقدمه

آنتی بادی های موجود در زرده تخم مرغ، IgY (Yolk Immunoglobulin) نامیده می شود که وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک آن با IgG پستانداران تفاوت دارد (۱-۳). IgY نقش پیشرونده ای بعنوان جایگزین آنتی بادی های پلی کلونال پستانداران ایفا می کند. اخیراً از IgY در تحقیقات بیوشیمیایی جهت تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها استفاده شده است (۴-۶). فاصله فیلوژنتیک بین پرندگان و پستانداران، زیاد است و آنتی بادی در برابر پروتئینهای پستانداران در پرندگان

آسانتر از خرگوش تولید می شود (۱). IgY از خون به زرده منتقل شده و می توان آنرا بدون استفاده از روشهای تهاجمی مانند خونگیری روزانه جمع آوری کرده و در ۴ درجه سانتیگراد به مدت طولانی نگهداری کرد. گزارشها بیانگر آن است که در مقایسه با خرگوش، مقدار خیلی بیشتری آنتی بادی ویژه را می توان از زرده تخم مرغهای ایمونیزه شده بدست آورد (۷). IgY به

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

در ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و در ۳۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب را دور ریخته و فاز 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 روسی، ۱۸/۳g سولفات آمونیوم (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،  $\text{pH}=7.4$ ) 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 خالص سازی IgY: الکتروفورز استات سلولز در  $\text{pH}=9$  به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ ثابت ۲۴۰V در سیستم «الفور» انجام شد و برای رنگ آمیزی 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 ۲۰۵-۳۶KD (Sigma marker)

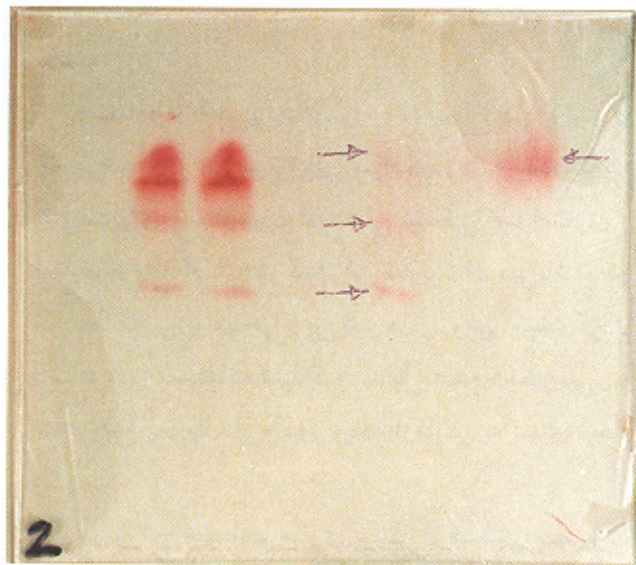
کمپلمان و رسپتور FC پستانداران متصل نشده و با فاکتورهای روماتوئیدی واکنش نمی‌دهد (۸).

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

#### 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، سدیم دودسیل سولفات (SDS)،  $\text{N}_3\text{N}_3\text{N}_3\text{N}_3$  - تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMED)، استاندارد وزن مولکولی پروتئین‌ها، ۲- مرکاپتواتانول (2ME)، بروموفنل بلو (BPP)، سولفات آمونیوم، محلول رنگی کوماسی برلیان بلو، محلول رنگی پانسو S از شرکت‌های سیگما، فارماسیا و مرک می‌باشد.

۱- جداسازی پروتئین‌ها از لیپیدهای زرده: از یک تخم مرغ «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



شکل ۳. الکتروفورز استات سلولز که نشانگر مراحل خالص سازی در روش استفاده از ژل فیلتراسیون می باشد: نمونه زرده رقیق شده با TBS (I, II) 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 پیش از یک باند را نشان داد ولی باند اصلی در ناحیه وزن مولکولی حدود ۶۳KD مشاهده شد که مربوط به زنجیره سنگین (H) ایمونوگلوبولین  $\gamma$  می باشد (شکل ۴).

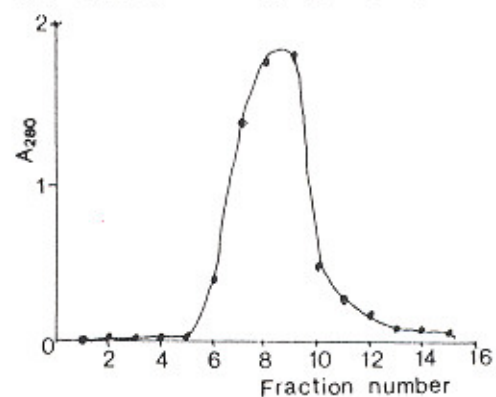


شکل ۴. الکتروفورز SDS-PAGE مخلوط فراکسیونهای خروجی کروماتوگرافی G-200 (I) و استاندارد وزن مولکولی پروتئینها (II)

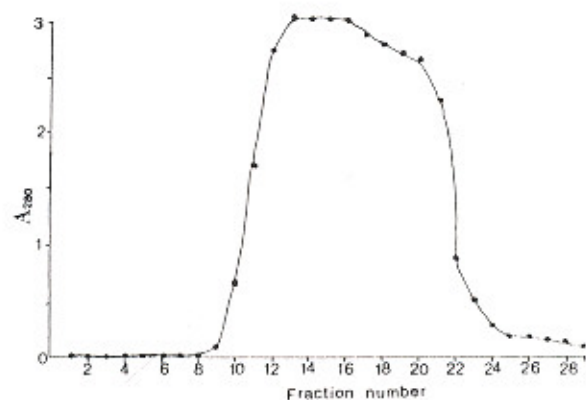
استفاده شد و با رسم نمودار لگاریتم وزن مولکولی در برابر فاصله طی شده به سانتیمتر، وزن مولکولی پروتئین مجهول محاسبه گردید.

#### یافته ها

غلظت پروتئین در زرده تخم مرغ ۱۹g/dl اندازه گیری شد. کروماتوگرامهای ژل فیلتراسیون سفادکس G-25 و G-200 نشان داده شده است (شکل ۱ و ۲). الکتروفورز استات سلولز بعد از فیلتراسیون G-25 نشانگر وجود سه باند پروتئینی مجزا می باشد که بعد از کروماتوگرافی G-200 فقط یک باند در ناحیه گاما الکتروفورزی باقی ماند.



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به نمونه بعد از رسوبدهی انتخابی با سولفات آمونیوم، که از ستون کروماتوگرافی دارای ژل سفادکس G-25 عبور داده شده و در فراکسیونهای ۲ml جمع آوری و A<sub>280</sub> خوانده شده است.



شکل ۲. کروماتوگرام G-200 مربوط به مخلوط فراکسیونهای خروجی از ستون سفادکس G-25 که دارای A<sub>280</sub> > 1 می باشند و از ستون سفادکس G-200 عبور داده شده است.

## بحث

استفاده از آنتی‌بادیهای زرده تخم مرغ در روشهای ایمنوشیمیایی و ایمنوترایی 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 اسیدی کردن - ساترِفُوژ، استفاده شد که بدلیل عدم دسترسی به ساترِفُوژ یخچال دار و دور زیاد، آزمایش به کندی انجام شد.

در روش خالص سازی با ژل فیلتراسیون، کروماتوگرافی سفادکس G-25 برای نمک زدایی 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 باقی ماند که دارای IgY است. در الکتروفورز SDS-PAGE یک باند اصلی مشاهده شد که بیانگر خالص سازی در طی ژل فیلتراسیون می‌باشد زیرا پروتئین موجود در ناحیه وزن مولکولی حدود ۶۳KD (زنجیر H ایمنوگلوبولین Y) خیلی بیشتر از پروتئین‌های ناخالص است در سایر تحقیقات (۱۰ و ۹) بعد از SDS-PAGE با رنگ آمیزی «کوماسی» زنجیر (H) IgY و با رنگ آمیزی حساس تر

«نیترا ت نقره» یا «ایمونوبلات» زنجیر سبک (L) IgY نیز نشان داده شده است که این زنجیر با رنگ آمیزی 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 - ساترِفُوژ و خالص سازی 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 انجام پذیر است و نیاز به دستگاههای پیچیده و هزینه زیاد ندارد. از محصولات تخلیص می‌توان در روشهای ایمنونواسی برای اندازه گیری مولکولها در مایعات بیولوژیک استفاده کرد ولی کاربرد آن در ایمنوترایی نیاز به خالص سازی بیشتر و انجام آزمایشهای تکمیلی دارد.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری و مساعدت شورای محترم پژوهشی به جهت تصویب و تأمین اعتبار طرح همچنین از آقایان دکتر علی اکبر 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



- performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-induced factor  $\alpha$ . *FASEB J* 1999; 13 (1): 81-8.
5. Fortgens PH, Dennison C, Elliott 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.
6. Lemamy GJ, Roger P, Mani JC, Robert M, Rochefort H, Brouillet 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. Larsson A, Karlsson A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassay to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 1991; 37(3): 411-14.
9. Ntakirutimana V, Demedts P, Van Sande M. A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. *J Immunol Methods* 1992; 153: 133-40.
10. Hassel A, Aspöck H. Purification of egg yolk immunoglobulins a two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *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 bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.