

## تولید و تخلیص ایمونوگلوبین علیه اشرشیاکلای در زرده تخم مرغ

محمد رضا نصیری<sup>1\*</sup> - علیرضا حق پرست<sup>2</sup> - محمد محسن زاده<sup>3</sup> - احمد حسن آبادی<sup>4</sup> - خدیجه نصیری<sup>5</sup> - زهرا رودباری<sup>6</sup> - محمد دوستی<sup>7</sup>

تاریخ دریافت: 1393/4/9

تاریخ پذیرش: 1394/2/19

### چکیده

تخم مرغ به عنوان یک منبع آنتی بادی جایگزین برای پستانداران می باشد. ایمونوگلوبین زرده تخم مرغ از مرغ به تخم مرغ انتقال می یابد و در زرده در مقادیر زیاد تجمع می یابد. ایمونوگلوبین Y به عنوان کاندیدایی برای جایگزینی با آنتی بیوتیک ها مطرح است. هدف از این تحقیق تولید و تخلیص ایمونوگلوبین علیه اشرشیاکلای در زرده تخم مرغ و بررسی حضور آنتی بادی ضد ایکلای در زرده با استفاده از روش سدیم دودسیل سولفات - ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید می باشد. مرغ های تخم گذار در سه دوره ایمنی زایی با آنتی ژن کامل اشرشیاکلای که توسط فرمالین کشته و همراه با ادجونت کامل فروند در نوبت اول و دوم و با ادجونت ناقص فروند در نوبت سوم ایمن شدند. تخم مرغ ها جهت تخلیص جمع آوری و تخلیص IgY براساس روش پولسون و با استفاده از پلی اتیلن گلیکول 6000 انجام شد. در نهایت با انجام الکتروفورز حضور این آنتی بادی را نشان دادیم. IgY از زرده تخم مرغ با موفقیت خالص سازی گردید. نتایج SDS-PAGE حضور باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلو دالتونی که موید حضور زنجیره های سبک و سنگین IgY است را نشان دادند. اثرات IgY بر موش ها نشان دادند، موش هایی که IgY را 72 ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند در برابر باکتری مصون ماندند و همچنین هنگامی که IgY با باکتری به مدت 24 ساعت انکوبه شده و به موش ها تزریق شدند، موش ها در برابر باکتری مقاوم ماندند. نتایج نشان دادند زرده تخم مرغ از مرغ های تخم گذار ایمن شده می تواند به عنوان منبع ایجاد ایمنی غیرفعال مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اشرشیاکلای O157:H7، آنتی بادی، ایمونوگلوبین Y، مرغ تخم گذار لگهورن.

### مقدمه

کاربردهای گسترده ای پیدا کرده است. ایمونوگلوبین Y زرده تخم مرغ باعث ایجاد ایمنی غیرفعال در جنین می شود و استخراج این آنتی بادی ها از زرده تخم مرغ در مقایسه با سایر آنتی بادی ها ارزان تر و آسان تر می باشد (7). خواص ضد باکتریایی IgY یکی از مهمترین جنبه های مطالعه IgY است. بسیاری از گزارش ها نشان می دهد که IgY می تواند دارای عملکرد ایمنی زایی در عفونت های باکتریایی و ویروسی در موجودات زنده باشد (15). استفاده خوراکی IgY اختصاصی علیه پاتوژن های بدن میزبان می تواند سبب محافظت در برابر همان دسته پاتوژن ها را بوجود آورد. افزایش روزمره باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک تحقیقات را به سمتی سوق می دهد که بتوان ماده ای در تعامل با آنتی بیوتیک در کنترل جمعیت های میکروبی بوجود آورد. ایمونوتراپی را می توان به عنوان یک درمان جانبی در برابر پاتوژن هایی که به راحتی توسط آنتی بیوتیک ها قابل درمان نمی باشند، توصیه کرد. تخم مرغ به عنوان یک ماده غذایی است که هیچ ریسک مسمومیت و عوارض جانبی در مصرف خوراکی بروز نمی کند (9). IgY عمده ترین کلاس آنتی بادی در سرم پرندگان است

تخم مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی بادی ها از جمله ایمونوگلوبین Y در زرده می باشد. امروزه تکنولوژی نوین استفاده از آنتی بادی های زرده تخم مرغ به منظور کاربردهای تشخیص و درمانی در حال توسعه می باشد. آنتی بادی زرده تخم مرغ (IgY) ایمونوگلوبین غالب زرده تخم مرغ می باشد (8) و هم تای IgG در پستانداران می باشد که امروزه

- 1- استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد،
  - 2- دانشیار گروه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
  - 3- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبریزان دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،
  - 4- استاد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد،
  - 5، 6 و 7 - دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام (ژنتیک مولکولی) دانشگاه فردوسی مشهد.
- \* - نویسنده مسئول: (Email: nassiry@um.ac.ir)

## مواد و روش‌ها

### آماده کردن آنتی‌ژن اشرشیاکلای برای تزریق

باکتری *E. coli O157:H7* از بیمارستان قائم مشهد دریافت شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت جهت رشد باکتری انکوبه شد. باکتری به صورت خطی روی محیط کشت بلاد آگار کشت داده شد. بعد از اینکه باکتری کشت داده شده به خوبی رشد کرد، یک پرگنه از باکتری برداشته شد و در 10 میلی لیتر محیط کشت مایع لوریا- برتانی<sup>4</sup> به مدت 24 ساعت کشت داده شد و در مرحله بعد جهت تهیه رقت های سریالی<sup>5</sup> استفاده گردید. در نهایت از غلظت  $1/6 \times 10^9$  cfu/mL باکتری اشرشیاکلای استفاده گردید. در ادامه جهت کشتن باکتری، مقدار 1200 میکرولیتر از باکتری در محیط کشت مایع (استوک اصلی) برداشته شد و در دور 10000rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس سوپرناتانت بیرون ریخته شد و 1200 میکرولیتر آب مقطر استریل بر روی پلت (رسوب) باکتری ریخته و ورتکس و سپس به مدت 5 دقیقه در دور 10000 سانتریفیوژ گردید. این عمل سه بار تکرار شد و در نهایت روی پلت باکتری مقدار 2 سی سی فرمالین 37 درصد ریخته و در دمای 37 درجه به مدت 36 ساعت انکوبه شد. یک کشت خطی از باکتری که تحت تیمار فرمالین بوده انجام شد تا از کشته شدن باکتری اطمینان حاصل شود. بعد از 24 ساعت محیط کشت را مورد بررسی قرار گرفت و اطمینان حاصل شد که هیچ باکتری رشد نکرده بود. بنابراین با استفاده از بافر فسفات سالین<sup>6</sup> هم حجم با مقدار اولیه ای که از باکتری در محیط کشت استفاده شد (1200 میکرولیتر) چهار بار عمل شستشو با بافر فسفات سالین یک درصد در دور 10000 به مدت 5 دقیقه انجام شد. سپس پلت حاصل را در 600 سی سی بافر فسفات سالین حل گردید و در فریزر 80- نگهداری شد.

### ایمن سازی مرغ‌های تخم‌گذار و جمع‌آوری تخم مرغ

سه قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید 16 هفته‌ای به عنوان گروه تیمار و سه قطعه مرغ تخم‌گذار لگهورن سفید به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. ایمن سازی در سه نوبت و به فاصله دو هفته صورت پذیرفت. سن شروع ایمن سازی در گروه‌های شاهد و کنترل در 16 هفتهگی بود که در اولین تزریق در گروه تیمار به هر مرغ 500 میکرولیتر از آنتی‌ژن محلول در بافر فسفات سالین ( $1/6 \times 10^9$  cfu/mL) به همراه 500 میکرولیتر از ادجونت کامل فروند در دو طرف عضله سینه به صورت داخل عضلانی تزریق شد و در

و از نظر عملکرد دارای تفاوت‌های قابل توجهی با ایمونوگلوبولین سرم پستانداران از جمله IgG می‌باشد. در سال‌های اخیر استفاده از آنتی‌بادی تولید شده در مرغ جهت شناسایی و مصارف درمانی گزارش شده است این آنتی‌بادی‌ها (IgY) به صورت خوراکی قابل استفاده بوده و در مقایسه با IgG می‌توان حجم زیادی از آنتی‌بادی را تولید کرد (10).

سویه‌های ایکلای سروتایپ O157:H7 به رده‌ای از سویه‌های ایکلای انتروهموراژیک تعلق دارد که مسبب اسهال خونی و غیرخونی، کولیت‌های هموراژیک<sup>1</sup> و سندروم اورمی همولیتیک<sup>2</sup> و پورپورای ترومبوتیک ترومبوسیتوپنیک<sup>3</sup> می‌شوند و تولید توکسینی شبیه شینگاتوکسین می‌کند (1). گاوهای شیری به عنوان منبع اولیه از باکتری *E. coli O157:H7* مورد ملاحظه می‌باشند و اغلب باکتری را در مدفوع خود دفع می‌کنند. این باکتری که مسبب بیماری می‌شود در ارتباط با مصرف آلوده گوشت گاو می‌باشد. ایکلای انتروهموراژیک در دفعات کم از گاوهای شیری، گوساله‌ها، و جوجه‌ها نیز جداسازی گردید. اما، در بعضی موارد، درصد بالایی از احشام دامداری، /کولای سروتایپ O157:H7 را پخش می‌کنند که بعضی از آنها مقاوم هستند. به طور قابل توجهی، گوساله‌ها پس از از شیرگرفتن در دفعات بیشتری نسبت به قبل از از شیرگرفتن، ارگانیزم را پخش می‌کنند (1).

IgY برای درمان عفونت *E. coli* در انسان پیشنهاد شده است. IgY در مقابل پروتئین‌هایی از *E. coli O157:H7* که مرتبط با چسبندگی می‌باشند، چسبندگی باکتریایی را در شرایط آزمایشگاهی در سلول‌های کشت شده کاهش داده است (5). پیشنهاد شده است که IgY ممکن به طور بالقوه کلونیزاسیون *E. coli O157:H7* در میزبان‌هایی مثل گاو و انسان را کاهش دهد (16).

IgY ترکیبی از دو شاخه سنگین (H) و دو شاخه سبک (L) می‌باشد و توسط پل‌های دی سولفات این دو شاخه پیوند یافته اند و دارای وزن مولکولی 180 کیلو دالتون بزرگتر از IgG در پستانداران می‌باشند (17). شاخه سبک شامل یک دومین متغیر (VL) و یک دومین ثابت (CL) است. شاخه سنگین IgY شامل یک دومین متغیر و چهار دومین ثابت (CH1، CH2، CH3، CH4) است که درهم سنجی با IgG که دارای سه دومین ثابت است و IgY فاقد منطقه hing قابل انعطاف نیز می‌باشد (9). هدف از این پژوهش تولید، تخلیص و ارزیابی ایمونوگلوبین زرده تخم مرغ (IgY) علیه ای. کولای در مرغ های تخم‌گذار است.

4- Luria-Bertani (LB)

5- Serial Dilution

6- Phosphate Buffer Saline(PBS)

1- Hemorrhagic Colitis (HC)

2- Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)

3- thrombotic thrombocytopenic purpura

در مرحله بعد غلظت پلی اتیلن گلیکول را به 12% (w/v) رسانیده شد. آنقدر محلول با همزن مغناطیسی هم‌زده شد تا هیچ اثری از پلی اتیلن گلیکول در ته و اطراف ظرف باقی نماند. پس از آن که پلی اتیلن گلیکول به خوبی حل گردید، محلول در دور 12000 rpm به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در 10 میلی لیتر از بافر فسفات سالینحل شد. رسوب بدست آمده مجدداً در پلی اتیلن گلیکول 12% حل گردید و پس از سانتریفیوژ در دور 12000 به مدت 10 دقیقه محلول رویی دور ریخته شد و رسوب دو تا سه بار با بافر فسفات سالین شستشو داده شد و معادل 5 میلی لیتر بافر فسفات سالین اضافه شد و در دمای 20- تا زمان استفاده نگهداری گردید.

### بررسی IgY به روش SDS-PAGE

با استفاده از روش lamli الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات پلی-آکریل امید ژل الکتروفورز انجام و از ژل 10 درصد استفاده شد. به منظور انجام الکتروفورز، IgY تخلیص شده از زرده تخم مرغ به مدت 10 دقیقه در بافر نمونه جوشانیده شد. الکتروفورز بوسیله ژل 10 درصد و در شدت جریان 100 ولت انجام و پس از اتمام الکتروفورز با کوماسی بلو رنگ آمیزی شد.

### تلقیح داخل صفاقی برای تعیین حداقل دوز کشنده (MLD)

هدف از این آزمایش تعیین کمترین میزانی از باکتری بود که به روش داخل صفاقی قادر به از بین بردن تمام موش ها است که در نتیجه قادر به بررسی حدت باکتری می باشیم. تعداد 18 موش با وزن بین 20 تا 22 گرم، هر یک 0/5 میلی لیتر با رقت های زیر مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفتند. تعداد 3 موش هم به عنوان شاهد با 0/5 میلی لیتر محلول فسفات سالین بافر تزریق شدند. همه موش ها ماده بودند. تزریق با سرنگ انسولینی 1 میلی لیتر صورت گرفت.

گروه 1: 5 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت  $1 + 1/6 \times 10^6$  موش شاهد

گروه 2: 5 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت  $1 + 1/6 \times 10^5$  موش شاهد

گروه 3: 5 موش به مقدار 0/5 میلی لیتر با رقت  $1 + 1/6 \times 10^4$  موش شاهد

### بررسی اثرات IgY بر روی موش ها

به منظور بررسی اثر IgY موش ها تحت تیمارهای مختلف قرار گرفتند. در هر گروه 6 موش ماده قرار داشت. گروه 1: 72 ساعت موش ها با IgY انکوبه شدند (موش ها IgY را 72 ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند) و سپس از طریق داخل صفاقی با 0/5 میلی لیتر باکتری

گروه شاهد 500 مایکرولیتر از ادجونت کامل فروند به همراه 500 مایکرولیتر بافر فسفات سالین در دو طرف عضله سینه به صورت داخل عضلانی تزریق گردید. دومین دوره ایمنی زایی در 18 هفتگی از سن مرغ ها صورت گرفت و جهت تزریق دوم، 500 مایکرولیتر ادجونت کامل فروند را با 500 مایکرولیتر آنتی ژن محلول در بافر فسفات سالین مخلوط گردید. در مورد گروه شاهد تزریقات مشابه گروه تیمار بود ولی محلول تزریق فاقد آنتی ژن ای. کولای بود و فقط حاوی بافر فسفات سالین بود. 500 مایکرولیتر ادجونت کامل فروند و 500 مایکرولیتر بافر فسفات سالین مخلوط گردید و به گروه شاهد تزریق گردید. سومین دوره ایمنی سازی در مرغ ها در سن 20 هفته ای صورت گرفت و جهت تزریق 500 مایکرولیتر ادجونت ناقص فروند و 500 مایکرولیتر آنتی ژن محلول در بافر فسفات سالین مخلوط گردید و به مرغ ها تزریق گردید. در مورد گروه شاهد تزریقات مشابه گروه تیمار بود ولی محلول تزریق فاقد آنتی ژن ای. کولای بود و فقط حاوی بافر فسفات سالین و 500 مایکرولیتر ادجونت ناقص فروند مخلوط گردید. از آنجایی که هدف ما بررسی تولید آنتی بادی در تخم مرغ بود تخم مرغ ها در 2 هفته بعد از آخرین تزریق (24 هفتگی) روزانه جمع آوری شدند و برای خالص سازی ایمونوگلوبین Y در یخچال در دمای 4 درجه سانتی گراد با ثبت تاریخ و گروه مثبت (تیمار) منفی (شاهد) جمع آوری و ذخیره گردید.

### تخلیص ایمونوگلوبین Y

برای خالص سازی از روش اصلاح شده پولسون استفاده گردید که سریع تر و درصد بازیابی IgY آن از بقیه روش ها بهتر بود (12). مراحل تخلیص به این صورت بوده که ابتدا سفیده تخم مرغ از زرده جدا گردیده که با این روش مقدار انبوهی از پروتئین های دیگر حذف می شود. سپس زرده را با یک پنس گرفته، در یک استوانه مدرج آنرا سوراخ کرده، غشای زرده را بیرون انداخته و حجم زرده داخل ستون یادداشت شد. زرده تخم مرغ ها با هم مخلوط گردید. دوبرابر حجم اولیه زرده به آن بافر فسفات سالین 100mM، PH=7.6، به زرده افزوده و به خوبی در همزن مغناطیسی هم زده تا محلول کاملاً یکنواخت مات زرد رنگی بدست آمد. سپس 3/5% (w/v) پلی اتیلن گلیکول 6000 افزوده شد و تا ناپدید شدن پلی اتیلن گلیکول هم زده شد و به مدت 20 دقیقه در دور 4500 rpm سانتریفیوژ و مایع رویی در ظرف دیگری برای جداسازی چربی نگهداری شد. حذف چربی به کمک فیلتراسیون از پنبه (این مرحله دو بار تکرار می شود) صورت گرفت. به این منظور یک تکه پنبه بهداشتی با قابلیت جذب رطوبت را در داخل یک قیف شیشه ای قرار داده و مایع رویی را دور ریخته و مایع بدست آمده جمع آوری گردید و حجم مایع فیلتر شده را سنجیده و ثبت شد.

آن تا 3 روز بررسی گردید. تلفات 12 ساعت اولیه محسوب نشد (مرگ ناشی از تزریق غلط). هیچ کدام از موش ها در طی 12 ساعت اول تلف نشده و تمامی موش های مورد تزریق در غلظت  $1/6 \times 10^4$  و  $1/6 \times 10^5$  سالم ماندند و تا 10 روز بعد همه ی آنها سالم بودند و هیچ تلفاتی دیده نشد. ولی تمامی موش ها در گروه 1 که با رقت  $1/6 \times 10^6$  مورد تزریق داخل صفاقی قرار گرفته بودند در فاصله زمانی 24 تا 48 ساعت بعد مردند و فقط دو موش شاهد زنده ماند.

### نتایج بررسی اثرات IgY بر روی موش ها

بررسی اثرات IgY بر روی درصد زندهمانی موش ها در گره اول، دوم، سوم و چهارم حاکی از زندهماندن تمامی موش ها بوده است و هیچ تلفاتی در این گروه ها مشاهده نشده بود. تمامی موش ها در گروه 5 بلافاصله 24 تا 48 ساعت بعد از تزریق داخل صفاقی باکتری مردند. نتایج نشان دادند موش هایی که IgY را 72 ساعت قبل تزریق داخل صفاقی باکتری، به صورت خوراکی در آب آشامیدنی دریافت کردند در برابر باکتری مصون ماندند. همچنین هنگامی که IgY با این باکتری به مدت 24 ساعت انکوبه شده و سپس موش ها به صورت داخل صفاقی تزریق شدند، موش ها در برابر باکتری *E. coli O157:H7* مصون ماندند.

*E. coli O157:H7* مورد تزریق قرار گرفتند. گروه 2: 72 ساعت موش ها با IgY انکوبه شدند و سپس از طریق داخل صفاقی با  $0/5$  میلی لیتر آب مقطر مورد تزریق قرار گرفتند. گروه 3: 24 ساعت  $0/5$  میلی لیتر *E. coli O157:H7* با مقدار  $0/5$  میلی لیتر IgY انکوبه کرده و سپس  $0/5$  میلی لیتر از محلول انکوبه شده جهت تزریق موش ها استفاده شد. گروه 4:  $0/5$  میلی لیتر IgY جهت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. گروه 5:  $0/5$  میلی لیتر باکتری *E. coli O157:H7* جهت تزریق داخل صفاقی استفاده شد.

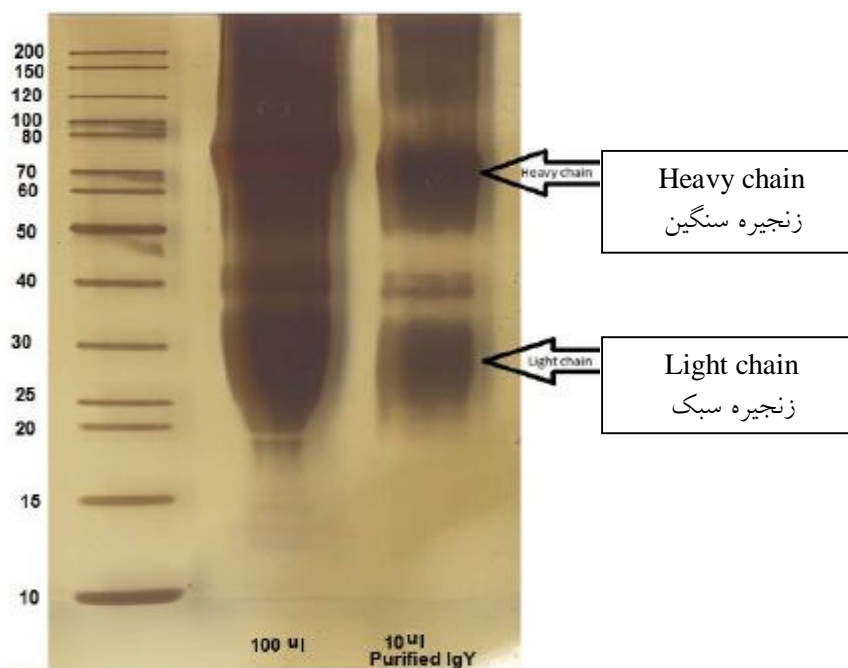
### نتایج و بحث

#### نتایج حاصل از خالص سازی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول 6000 و الکتروفورز SDS-PAGE

نتایج نشان دادند IgY از زرده تخم مرغ با موفقیت خالص سازی گردید و نتایج بدست آمده از SDS-PAGE حضور باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلودالتونی که مؤید حضور زنجیره های سبک و سنگین IgY است را نشان داد (شکل 1).

#### نتایج حاصل از تلقیح داخل صفاقی به موش ها

تزریق داخل صفاقی با سه غلظت متوالی صورت گرفت و تلفات



شکل 1- باندهای پروتئینی 27 و 67 کیلودالتونی که مؤید حضور زنجیره سبک و سنگین IgY می باشد. لاین اول: مارکر وزن پروتئینی 200 kDa، لاین دوم و سوم: IgY: تخلیص شده از زرده تخم مرغ.

Figure 1- 27 kDa and 67 kDa protein bands that have confirmed the presence of light chain and heavy chain of IgY. Line 1: protein marker (200kDa), line 2 and 3: purified IgY from egg yolk.

آزمایشات مشاهده شد موش‌ها ایمن شده با IgY توانستند در برابر *E. coli O157:H7* مصون بمانند که این پدیده را می‌توان به دلیل فعالیت باندشوندگی IgY با باکتری مورد نظر دانست که باعث مهار باکتری می‌شود. بنابراین این مقاومت موش‌ها در برابر *E. coli* می‌تواند به دلیل دریافت IgY توسط موش‌ها باشد، اما الزاماً به این معنی نمی‌باشد که IgY حتماً از تخم‌مرغ مرغ‌هایی باشد که با *E. coli* ایمن شده‌اند چون ممکن است مرغ‌ها در محیطی زندگی کنند که جمعیتی از باکتری‌ها وجود داشته باشد و در برابر آن ایمن شده باشند.

### نتیجه‌گیری کلی

در عرصه کاربردهای متنوع آنتی‌بادی‌ها، تکنولوژی جدید استخراج IgY از زرده تخم‌مرغ در حال گسترش است. این ایمونوگلوبولین توسط مرغ تولید شده و به درون زرده تخم‌مرغ برای ایجاد ایمنی غیر فعال برای جنین، انتقال می‌یابد که می‌توان با تزریق باکتری کشته شده ایکلای به عنوان منبع آنتی‌ژن به مرغ‌های تخمگذار و تکمیل دوره ایمنی‌زایی در مرغ به IgY اختصاصی دست یافت و می‌توان با توجه به بوجود آمدن سویه‌های مقاوم باکتریایی، از این محصول در کنار یا به جای آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کرد و از آن به عنوان مکمل‌های درمانی استفاده کرد. ایمن سازی مرغ‌های تخم‌گذار روشی عالی برای تولید مقادیر زیادی آنتی‌بادی می‌باشد چرا که تولید آنتی‌بادی با این روش استرس را نمی‌باشد و جداسازی و خالص سازی IgY نسبتاً ساده می‌باشد و تولید بالا می‌باشد در ادامه تحقیقات فناوری IgY، بهبود پروتکل‌های ایمن سازی و کمکی و همچنین پیشرفت‌هایی در تکنیک‌های استخراج و افزایش تولید آنتی‌بادی، بدون شک منجر به برنامه‌های جدیدی برای ایمنی درمانی IgY در بهبود سلامت انسان و حیوان می‌شود.

### سپاسگزاری

پژوهش حاضر حاصل طرح تحقیقاتی با شماره 24241 از دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی که اعتبار انجام این پژوهش را تأمین نمود صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند که ایمنی‌زایی غیرفعال توسط تجویز خوراکی آنتی‌بادی‌های اختصاصی از منابع مختلف به عنوان مثال کلاستر موصون شده یا ایمونوگلوبولین زرده تخم‌مرغ (IgY) می‌تواند استراتژی‌های اقتصادی و کارایی برای مهار عفونت‌های روده‌ای در حیوانات باشد (11). تخم‌مرغ به عنوان ماده مغذی شناسایی شده است که شامل مقدار زیادی آنتی‌بادی‌ها از جمله IgY در زرده تخم‌مرغ می‌باشد. زرده تخم‌مرغ شامل 100-150 میلی‌گرم IgY از حجم کل زرده می‌باشد که 10% از آن IgY اختصاصی است (13). آنتی‌بادی‌های موجود در زرده تخم‌مرغ به عنوان یک آنتی‌بادی ایجاد کننده ایمنی غیر فعال، ارزان و تولید آسان تشخیص داده شده و مورد توجه قرار گرفته‌اند و مؤثر برای درمان و پیشگیری می‌باشد (2 و 6). از مزایای استفاده از زرده تخم‌مرغ به عنوان منبع تولید آنتی‌بادی، کاهش موارد استفاده از حیوانات می‌باشد. به دلیل اینکه مرغ‌ها قادرند در مقایسه با حیوانات آزمایشگاهی مقادیر بالاتری از آنتی‌بادی تولید کنند، می‌توانند در آینده جایگزین مناسبی برای حیوانات آزمایشگاهی به شمار آید. مرکز اعتبار سنجی روش‌های جایگزین در اروپا استفاده از آنتی‌بادی زرده را به دلیل عدم برهم زدن رفاه و آسایش حیوان، جهت جایگزینی با آنتی‌بادی پستانداران توصیه می‌کند (13). Chae و همکاران (2006) اثرات آنتی‌بادی زرده تخم‌مرغ تولید شده در پاسخ به بخش‌های مختلف آنتی‌ژنیک *E. coli O157:H7* را مورد بررسی قرار دادند و نتایج‌ها نشان داد که سطح پاسخ ایمنی در برابر آنتی‌ژن کل سلولی باکتری *E. coli O157:H7* بعد از شروع تزریق به مقدار بیشتری افزایش یافت و گزارش کردند که IgY اختصاصی ضد *E. coli O157:H7* می‌تواند از ضررهای اقتصادی مربوط به سلامتی در انسان و حیوان پیشگیری کند (3). همچنین در مطالعه Cipolla و همکاران (2001) تأثیر بخشی IgY در متوقف کردن فعالیت *E. coli O157:H7* گزارش شده است (4). در مطالعه‌ای اثر مهارکنندگی IgY بر روی *E. coli O157:H7* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که فعالیت باندشوندگی IgY اثر مهاری روی رشد *E. coli O157:H7* دارد و عملکرد آنتی‌باکتریال IgY نتیجه اثر متقابل IgY با اجزای سطحی *E. coli O157:H7* می‌باشد که در آزمایشات ایمونوفلورسنس ثابت شده است (14). نتایج مطالعه حاضر با نتایج Chae و همکاران در سال 2006 مطابقت دارد. همانطور که در

### منابع

- 1- Callaway, T. R., M. A. Carr., T. S. Edrington., R. C. Anderson., and D. J. Nisbet. 2009. Diet, Escherichia coli O157:H7, and Cattle: Current Issues in Molecular Biology, 11: 67- 80.
- 2- Carlander, D., H. Kollberg., P. Wejaker., and A. Larsson. 2002. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. Journal of Immunology Research, 21 (1): 1-6.
- 3- Chae, H. S., N. K. Singh., C. N. Ahn., Y. M. Yoo., S. G. Jeong., J. S. Ham., and D. W. Kim. 2006. Effects of Egg Yolk Antibodies Produced in Response to Different Antigenic Fractions of *E. coli O157:H7* on *E. coli*

- Suppression. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 19 (11): 1665-1670.
- 4- Cipolla, A., J. Cordeviola., H. Terzolo., G. Combessies., J. Bardon., R. Nosedà., A. Martinez., D. Medina., C. Morsella., and R. Malena. 2001. Campylobacter fetus diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. *Altex-AlternativenZuTierex-perimenten*, 18 (3): 165-170.
  - 5- Cook, S. R., P. K. Maiti., R. DeVinney., E. Allen-Vercoc., S. J. Bach., and T. A. McAllister. 2007. Avian- and mammalian derived antibodies against adherence-associated proteins inhibit host cell colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (4): 1206-1219.
  - 6- Devi, C. M., M. V. Bai., A. V. Lal., P. R. Umashankar., and L. K. Krishnan. 2002. An improved method for isolation of anti-viper venom antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 51 (2): 129-138.
  - 7- Gassmann, M., P. Thommes., T. Weiser., and U. Hubscher. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *The FASEB Journal*, 4 (8): 2528-2532.
  - 8- Goldsby, R. A., T. J. Kindt., J. Kuby., and B. A. Osborne. 2002. *Kuby Immunology*, 5th Edition. W. H. Freeman
  - 9- Hatta, H., K. Tsuda., S. Akachi., M. Kim., and T. Yamamoto. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57 (3): 450-454.
  - 10- Kovacs-Nolan, J., and Y. Mine. 2005. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. *Journal of Immunological Methods*, 296(1-2):199-209.
  - 11- Mine, Y., and J. Kovacs-Nolan. 2002. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food*, 5 (3): 159-169.
  - 12- Polson, A., M. B. von Wechmar., and M. H. van Regenmortel. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Commun*, 9 (5): 475-493.
  - 13- Schade, R., C. Staak., C. Hendriksen., M. Erhad., H. Hugl., G. Koch., A. Larsson., W. Pollmann., M. van Regenmortel., E. Rijke., H. Spielmann., H. Steinbusch., and D. Straughnan. 1996. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. *Alternatives to laboratory animals*, 24: 925-934.
  - 14- Sunwoo, H. H., E. N. Lee., K. Menninen., M. R. Suresh., and J. S. Sim. 2006. Growth Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, 67 (4): 1486-1494.
  - 15- Van Nguyen, S., K. Umeda., H. Yokoyama., Y. Tohya., and Y. Kodama. 2006. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70 (1): 62-64.
  - 16- Wang, Q., X. J. Hou., K. Cai., T. Li., Y. N. Liu., W. Tu., L. Xiao., S. Bao., J. Shi., X. Gao., H. Liu., R. Tian., and H. Wang. 2010. Passive protection of purified yolk immunoglobulin administered against Shiga toxin 1 in mouse models. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(12):1003-1010.
  - 17- Warr, G. W., K. E. Magor., and D. A. Higgins. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 16 (8): 392-398.



## Production and Purification Immunoglobulin against *E. coli* in Egg Yolk

M. R. Nassiri<sup>1\*</sup> - A. Haghparast<sup>2</sup> - M. Mohsenzadeh<sup>3</sup> - A. Hassan Abadi<sup>4</sup> - K. Nasiri<sup>5</sup> - Z. Roudbari<sup>6</sup> -  
M. Doosti<sup>7</sup>

Received: 30- 06-2014

Accepted: 09-05-2015

**Introduction** Chicken is the only avian species in which polyclonal antibodies, like IgG is transported from the hen to the egg yolk in a similar manner as the transport of mammalian IgG from the mother to the fetus. Immunoglobulin Y in the chicken is transported to the egg and accumulates in the egg yolk in large quantities. IgY is an egg yolk antibody that has been used widely for treatment and prevention of infections in humans and animal. IgY is used for passive protection of the pathogen infections such as *Escherichia coli*, bovine and human rotavirus, bovine coronavirus, salmonella, staphylococcus and Pseudomonas. IgY is a promising candidate as an alternative to antibiotics. *Escherichia coli* strains of serotype O157: H7 belongs to a family of pathogenic *E. coli* called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains responsible for hemorrhagic colitis, bloody or non-bloody diarrhea, and hemolytic uremic syndrome in humans. This strain of *E. coli* pathogenises by adhering to host intestinal epithelium and forming bacterial colonies. The purpose of this study was to produce and purify immunoglobulin Y against *E. coli* O157:H7 and develop specific polyclonal anti *E. coli* antibody in the egg yolk.

**Materials and Methods** Sixteen-week-old laying hens (Mashhad, Iran) were kept in individual cages with food and water ad libitum. Immunization of hens was performed by intramuscularly injecting killed *E. coli* O157: H7 with an equal volume of Freund's complete adjuvant into two sides of chest area (Sigma, USA) for the first immunization. Two booster immunizations followed up using complete and incomplete Freund's adjuvants in two weeks interval. Freund's adjuvant without antigen was injected to the control group. Two weeks after the last injection, the eggs were collected daily for eight weeks, marked and stored at 4 °C. In order to IgY purification, eggs were collected. Purification of IgY from egg yolk was based on Polson and using PEG6000. Finally, the presence of antibody IgY was confirmed using SDS-PAGE. Purification of IgY was carried out by polyethylene glycol precipitation method using PEG 6000 powder (Merck, Germany) based on method of Polson. The purified IgY against *E. coli* was separated using 10% SDS-PAGE. In order to investigate the effect of the specific anti-*E. coli* antibody, mice (Razi, Institute of Iran) were randomly distributed into five experimental groups (6mice/group). The mice were kept in conventional animal facilities and received water and food ad libitum. All animal care and procedures were in accordance with institutional policies for animal health and well-being. Experimental groups were including group 1 (mice received IgY orally in drinking water 72 hours before intraperitoneal injection of bacteria and then injected intraperitoneally with 0.5 ml of bacteria *E. coli* O157: H7), group 2 (mice received IgY orally in drinking water 72 hours before the injection and then injected intraperitoneally with 0.5 ml of deionized water), group 3 (0.5 ml of *E. coli* O157: H7 incubated with 0.5 ml of the specific anti-*E. coli* IgY and then 0.5 ml of the incubated solution injected to mice intraperitoneally), group 4 (mice injected with 0.5 ml of IgY) and group 5 (mice received 0.5 ml of *E. coli* O157: H7).

**Results and Discussion** We obtained specific egg yolk antibody against *E. coli* O157: H7 by immunizing hens with the killed *E. coli* O157: H7 antigen. The results showed that the IgY was successfully purified from egg yolk. SDS-PAGE analysis showed presence of protein bands 27kDa and 67 kDa of IgY, which correspond to IgY light and heavy chains. Effects of IgY on mice showed that mice received IgY orally in

1- Professor, Department of Animal Science and Institute of biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,

2,3- Associate professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran,

4- Professor, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran,

5, 6, 7- PhD student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(\*- Corresponding authoremail: nassiry@um.ac.ir)

drinking water 72 hours before intraperitoneal injection were protected against bacteria. Also, when specific anti-*E. coli* IgY was incubated with *E. coli* O157: H7 for 24 hours and then it was injected to mice led to mice protected against bacteria. The results of our study were agreement with the results of Chae et al (2007). We indicated mice immunized with specific anti-*E. coli* IgY could be protected against *E. coli* O157: H7. This phenomenon could be due to specific binding activity of IgY with bacteria that led to the inhibition of bacterial growth *E. coli* O157: H7.

**Conclusion** The effectiveness of IgY in suppressing the activity of *E. coli* O157:H7 was indicated in our study. This could be inferred from the results of the current study that IgY in the egg yolk could prevent greater economic losses due to human and animal health from pathogenic bacteria such as *E. coli* O157:H7. These finding indicated that egg from immunized hens are potentially useful source of passive immunity.

**Keywords:** Antibody, *E. coli* O157:H7, Immunoglobulin Y, Laying hens.