

# Nghiên cứu tạo và tinh sạch kháng thể đa dòng IgY từ lòng đỏ trứng

Trần Thị Sao Mai<sup>1\*</sup>, Đặng Thị Oanh<sup>1</sup>, Đặng Thị Hương<sup>1</sup>,  
Lê Thành Long<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lan Hương<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

(Ngày đến tòa soạn: 27/7/2020; Ngày chấp nhận đăng: 25/9/2020)

## Tóm tắt

Kháng thể đa dòng được tinh sạch từ huyết thanh của động vật có vú đã tiêm chủng góp phần đáng kể vào nghiên cứu khoa học và chẩn đoán. Việc sản xuất kháng thể trong lòng đỏ trứng do gà đẻ, đã dẫn đến sự phát triển của một phương pháp thay thế để tạo kháng thể ít gây nguy hiểm cho động vật. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy có thể chế tạo được một lượng lớn kháng thể IgY kháng albumin huyết thanh bò (BSA) với hàm lượng kháng thể IgY sau tinh sạch là khoảng 8 mg/mL dịch nhũ tương lòng đỏ trứng, độ tinh sạch kháng thể cao và có hoạt tính kháng BSA.

**Từ khóa:** IgY, lòng đỏ trứng, sản xuất, albumin huyết thanh bò, tinh sạch.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, việc sử dụng kháng thể trong chẩn đoán đã được thực hiện rộng rãi với một số ưu điểm của chúng. Kháng thể từ lòng đỏ trứng IgY được sản xuất bằng phương pháp gây miễn dịch cho gà mái để thu kháng thể đặc hiệu từ trứng gà. Kháng nguyên đích được tiêm vào gà dẫn đến một phản ứng miễn dịch dịch thể. Đó là biểu hiện ban đầu của quá trình sản xuất IgY đặc hiệu trong huyết thanh của gà đã được tiêm chủng, tiếp theo là sự vận chuyển IgY đặc hiệu vào trong lòng đỏ trứng. Sau khi phản ứng miễn dịch đã được tạo ra, việc vận chuyển IgY đi qua ống dẫn trứng mất khoảng 05 - 06 ngày [1]. Các kháng thể đặc hiệu này chiếm 0,1- 10% của tổng số IgY [2]. Tuy nhiên, có một tỷ lệ nhất định (10 - 15%) gà được tiêm chủng nhưng có thể đáp ứng thấp với các kháng nguyên nhất định [3].

Thành phần chính của lòng đỏ trứng gà là lipid và protein. IgY là lipoprotein có tỷ trọng thấp và hòa tan được trong nước. Tất cả các phương pháp tinh sạch IgY, ban đầu đều cần loại bỏ lipid và lipoprotein, bước tiếp theo là tinh sạch IgY. Hiện nay, một số phương pháp tách chiết và tinh chế IgY gà đã được mô tả và có thể được chia thành hai nhóm chính: Nhóm phương pháp kết tủa (liên quan đến amoni, natrisulfat, natriclorua, polyetylenglycol (PEG), axit caprylic và caragenean[1-2]); nhóm phương pháp sắc ký (sắc ký ái lực, sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel [1, 4, 5]), đồng thời có thể kết hợp sử dụng kỹ thuật siêu lọc.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã áp dụng quy trình tạo kháng thể IgY của Agro-Bio (2011) [6] và chọn phương pháp tinh sạch kháng thể từ lòng đỏ trứng theo phương pháp của PetrHokder phát triển năm 2013 [7] cho việc tạo và tinh sạch kháng thể IgY kháng BSA. Kết quả

\*Điện thoại: 0936391579

Email: t.saomai@yahoo.com.vn

của nghiên cứu góp phần cho thấy khả năng tạo ra một lượng lớn IgY tinh khiết từ trứng gà. Kết quả nghiên cứu là tiền đề để ứng dụng sản xuất kháng thể kháng độc tố, vi khuẩn, ... làm nguyên liệu cho phản ứng miễn dịch và chẩn đoán.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Động vật thí nghiệm: Gà mái dòng thuần Leghorn trắng 18 tuần tuổi gồm 06 con, có đặc điểm tốt cho việc đẻ trứng (vóc dáng cân đối, không dị tật ở mỏ, ngón chân, móng, tích phát triển lớn, màu đỏ tươi, long óng mượt, cánh ép sát vào thân) được mua và nuôi tại Công ty Cổ phần phát triển sinh học Hoàng Long, Ba Vì, Hà Nội.

### **2.2. Hóa chất, chất chuẩn**

- *Các sinh phẩm:* Tá dược bao gồm FCA (Freund's Complete Adjuvant) và FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) (Sigma); Thang chuẩn điện di protein (Thermo Scientific).

- *Các vật liệu và hóa chất:* huyết thanh bào thai bê (BSA) (Sigma), NaCl (Sigma), HCl (Sigma), agarose, acrylamide, bis-acrylamide, TEMED (Sigma), ethidium bromide 10% SDS (Invitrogen) và 10% APS (Sigma), blue Coomassie, dung dịch rửa gel SDS (40% methanol, 10% axit axetic, Tween 20 (Sigma)).

### **2.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### *2.3.1. Quy trình sản xuất kháng thể IGY đa dòng đặc hiệu trên gà white Leghor*

Gà được gây miễn dịch để sản xuất kháng thể đa dòng IgY kháng BSA áp dụng theo quy trình sản xuất kháng thể IgY của Agro-Bio 2011, cụ thể:

- Tá dược sử dụng FCA chủng lần 1, FIA chủng những lần tiếp theo;
- Liều lượng kháng nguyên: tiêm BSA với liều lượng là 1mg, trộn lẫn BSA nồng độ 2 mg/mL với tá dược Freund theo tỷ lệ 1 : 1;
- Đường tiêm và thể tích tiêm chủng: Tiêm bắp, tiêm gà ở hai vị trí là bên trái và bên phải cơ ngực, với thể tích 1 mL/1 con gà;
- Tần số tiêm chủng: gà được tiêm 04 lần, lần lượt vào các ngày: 0, 14, 28, 56;
- Trứng được thu thập từ ngày 40 sau khi tiêm lần 1 đến ngày 70.

#### *2.3.2. Tinh sạch kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng*

Để có được IgY với độ tinh sạch cao, kháng thể này được tinh sạch từ lòng đỏ trứng theo phương pháp của PetrHokder phát triển năm 2013, gồm các bước sau:

Bước 1: Loại lipid bằng cách gây kết tủa lạnh lòng đỏ trứng

- Vò trứng được làm vỡ thành hai nửa và lòng đỏ được tách khỏi lòng trắng càng nhiều càng tốt.

- Chuyển lòng đỏ vào một giấy lọc và lăn nó trên giấy để loại bỏ nốt lòng trắng trứng còn sót lại trên bề mặt lòng đỏ.

- Lòng đỏ sau khi được tách khỏi lòng trắng sẽ bị chọc thủng bằng đầu pipet hoặc mũi dao nhọn vô trùng và đổ vào ống falcon 50 mL vô trùng, đo thể tích.

- Pha loãng lòng đỏ trứng với 1 thể tích PBS, 5 thể tích nước cất, 1 thể tích HCl 0,5M, chỉnh pH = 5,0 với HCl 0,5M. Trộn đều dung dịch và làm đông ở - 20°C. Tiếp theo, làm tan bằng ở nhiệt độ phòng và lọc bằng giấy lọc.

Bước 2: Tủa phân đoạn IgY bằng NaCl

- Thêm NaCl tinh khiết vào dung dịch thu được sau khi lọc bằng giấy lọc, chỉnh pH = 4,0 với HCl 0,5 M để đạt 8,8.

- Lắc đều ống dịch để tạo kết tủa trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm 3.700 g trong 20 phút.

- Tiếp theo, loại dịch nổi và hòa tan cặn thu được bằng PBS với thể tích bằng thể tích dịch lòng đỏ trứng.

Sản phẩm protein thu được sau tinh sạch lòng đỏ trứng được xác định nồng độ bằng máy Nano Drop ở bước sóng 260/280, điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamid 12,5%.

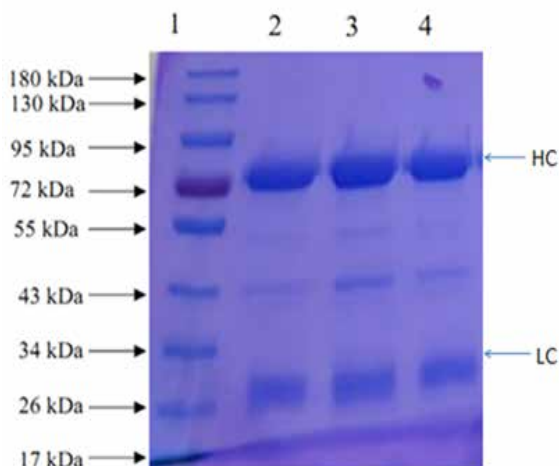
### 2.3.3. Phương pháp miễn dịch xuyên tâm kiểm tra hoạt tính kháng thể IgY

Chuẩn bị 1,2% agarose trong đệm PBS 1X: Cân 0,48 g agarose và cho 40 mL PBS 1X (1,2% agarose) vào bình thủy tinh. Đun nóng cho đến khi agarose tan trong đệm, làm mát dung dịch đến khoảng 55°C. Phản ứng cần khoảng 6 ml dung dịch agarose 1,2%. Bổ sung 120 µL dịch kháng thể vào 6 mL dung dịch agarose, trộn đều và đổ ra đĩa Petri. Để đĩa nguội và đông trong 30 phút. Đục các giếng trên gel. Từ đáy của đĩa, đánh số giếng. Trộn kháng nguyên nhẹ nhàng và cẩn thận, dùng pipet lấy 15µL của kháng nguyên và nhỏ chúng vào các giếng. Đặt đĩa trong tủ 37°C, không được đảo ngược đĩa (có thể tạo buồng ẩm bằng cách giữ bông ẩm trong hộp đựng các đĩa Petri thí nghiệm). Kiểm tra các đĩa sau 18 - 24 h, sẽ có thể nhìn thấy các vòng tròn mờ đục xung quanh mỗi giếng nơi mà kháng thể và kháng nguyên đã kết tủa.

## 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

### 3.1. Tách chiết và tinh sạch kháng thể IgY

Việc lựa chọn phương pháp tinh sạch IgY cụ thể phụ thuộc vào hiệu suất và độ tinh khiết mong muốn, ứng dụng cuối cùng của IgY, cũng như chi phí vật liệu, công nghệ, quy mô tinh chế (phòng thí nghiệm hay công nghiệp) và tác động đối với môi trường (quản lý chất thải). Khi dùng các phương pháp tinh sạch khác nhau sẽ thu được IgY với độ tinh sạch khác nhau. Phương pháp kết tủa liên quan tới pha loãng nước, chỉnh pH, đóng băng (- 20°C), tan băng (4°C) và bổ sung ammonium sulfate sẽ thu được IgY có độ tinh sạch là 72,25%. Phương pháp kết tủa được Petr Hodek tối ưu hóa năm 2013 với độ tinh sạch của IgY là 97%. Phương pháp kết tủa sử dụng PEG có độ tinh sạch là 89,39%. Trong nghiên cứu này, phương



Giếng 1: thang protein chuẩn; Giếng 2,3,4: IgY sau tinh sạch bằng phương pháp Petr Hokder 2013. HC - chuỗi nặng, LC - chuỗi nhẹ.

**Hình 1.** Kết quả điện di SDS-PAGE kháng thể IgY sau tinh sạch bằng phương pháp Petr Hokder 2013

pháp của Petr Hodek được lựa chọn, bởi vì phương pháp này cho phép đạt được độ tinh sạch cao hơn nhiều so với của các phương pháp khác. Ngoài ra, phương pháp này có thể sản xuất với quy mô lớn, chi phí thấp.

Độ tinh sạch của chế phẩm IgY sau các bước tách chiết và tinh sạch qua cột sắc ký được đánh giá bằng kỹ thuật SDS-PAGE trong điều kiện biến tính, kết quả được thể hiện ở Hình 1.

Hình ảnh điện di trên gel polacrylamide cho thấy sản phẩm thu được sau tinh sạch bằng phương pháp do Petr Hokder có độ tinh sạch cao tại các giếng 2, 3, 4 (Hình 1), xuất hiện hai băng protein đậm với kích thước khoảng 67 kDa và khoảng 25 kDa, phù hợp với kích thước chuỗi nặng (HC) và chuỗi nhẹ (LC) của IgY. Sau khi hoàn thành quá trình tinh sạch IgY, lượng protein thu được đo bằng máy NanoDrop ở bước sóng 260/280 nm đạt nồng độ là 8,0 mg/mL. Kết quả của nhóm nghiên cứu gần tương đương với kết quả nghiên cứu của P. Hokder và cộng sự năm 2013 [7], với lượng kháng thể IgY thu được sau tinh sạch là 8,9 mg/mL [7]. Mỗi quả trứng có 12 - 15 mL nhũ tương lòng đỏ tương đương với 96 - 120 mg IgY.

### **3.2. Kiểm tra hoạt tính kháng thể**

Để kiểm tra hoạt tính kháng thể IgY, phản ứng miễn dịch xuyên tâm được thực hiện (Hình 2). Kháng thể IgY sau khi tinh sạch, được hòa tan trong thạch và kháng nguyên được nhỏ vào giếng. Trong thí nghiệm này, kháng nguyên BSA được nhỏ vào 4 giếng ở bốn nồng độ khác nhau (0,25, 0,5, 1,0 và 2,0 mg/mL). Các nồng độ kháng nguyên BSA khuếch tán từ các giếng vào gel agarose có chứa kháng thể.



*Nồng độ kháng nguyên BSA trong các giếng: 0,25mg/mL; 0,5 mg/mL; 1 mg/mL; 2 mg/mL*

**Hình 2.** *Phản ứng miễn dịch xuyên tâm xác định hoạt tính kháng thể IgY kháng BSA*

Kết quả sau 24 h vòng ngưng kết được hình thành ở các giếng nồng độ kháng nguyên 0,5, 1,0 và 2,0 mg/mL, còn ở nồng độ kháng nguyên 0,25 mg/mL không hình thành vòng ngưng kết. Điều này chứng tỏ kháng thể IgY sau tinh sạch đã có thể hiện hoạt tính kháng BSA trong các giếng phản ứng có nồng độ kháng nguyên 0,5, 1,0 và 2,0 mg/mL. Giếng có nồng độ kháng nguyên 0,25 mg/mL không thấy có vòng ngưng kết do nồng độ kháng nguyên ở giếng này thấp nhất so với các giếng thí nghiệm, nồng độ kháng nguyên này không đủ để màng ngưng kết kháng nguyên - kháng thể được hình thành rõ đến mức có thể nhìn thấy được.

### **4. KẾT LUẬN**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo và tinh sạch được kháng thể IgY kháng BSA có độ tinh sạch cao và có hoạt tính kháng BSA. Kết quả của nghiên cứu này có ý nghĩa thực tiễn cao trong việc ứng dụng tạo kháng thể cho các kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch và các nghiên cứu chẩn đoán với các kháng nguyên là tác nhân gây bệnh hoặc độc tố.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. Schade, E. G. Calzado, R. Sarmiento, P. A. Chacana, J. Porankiewicz-Asplund and H. R. Terzolo, “Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology) - A Review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine”, *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, vol. 33, no.2, pp.129-154, 2005.
- [2]. P. Hodek and M. Stiborová, “Chicken Antibodies - Superior Alternative for Conventional Immunoglobulins”, *Proc Indian Natn Sci Acad*, B69, no.4, pp.46-468, 2003.
- [3]. C. Marcq, A. Théwis, D. Portetelle and Yves Beckers, “Refinement of the production of antigen-specific hen egg yolk antibodies (IgY) intended for passive dietary immunization in animals. A review”, *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, vol.17, no.3, pp 483-493, 2013.
- [4]. L. S. Munhoz, G. D’Ávila Vargas, G. Fischer, M. de Lima, P. A. Esteves, S. de Oliveira Hübner, “Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic”, *Ciência Rural*, vol.44, no.1, pp.153-160, 2014.
- [5]. Thermo Fisher Scientific, “*Thermo Scientific Pierce Antibody Production and Purification*”, Technical Handbook 2, pp.1-776, vi.scribd.com/document/69292881/Radial-Immunodiffusion, 2010.
- [6]. Agro-Bio, “Protocol for the production of chicken polyclonal antibodies specific IgY”, *Version 2011/01*.
- [7]. P. Hodek, P. Trefil, J. Simunek, J. Hudecek and M. Stiborova, “Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations”, *International Journal of Electrochemical Science*, vol.8, pp.113-124, 2013.

## Production and purification of IgY antibodies from egg yolk

Tran Thi Sao Mai<sup>1</sup>, Dang Thi Oanh<sup>1</sup>, Dang Thi Huong<sup>1</sup>

Le Thanh Long<sup>1</sup>, Nguyen Thi Lan Huong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute for Food Control

<sup>2</sup>University of Science, Vietnam National University, Hanoi

### Abstract

Polyclonal antibodies from vaccinated mammalian have made a significant contribution to scientific research and diagnosis. The fact that recent technologies allow the production of antibodies in egg yolks laid by hens has led to the development of an alternative to antibody production that is less dangerous to animals. The results of this study showed that it is possible to produce a large amount of IgY antibody to bovine serum albumin (BSA), content of about 8 mg/mL of egg yolk emulsion. The anti-BSA IgY antibodies with high purity and anti-BSA activity.

**Keywords:** IgY, production, egg yolk, purification, bovine serum albumin.