

*Salmonella enteritidis*의 편모항원에 대한 난황항체의 생산

김 정 우
단국대학교 동물자원과학과

Production of Egg Yolk Antibodies against Flagella Antigen of *Salmonella enteritidis*

J. W. Kim

Department of Animal Science and Resources, Dankook University,
Cheonan, Korea, 330-714

ABSTRACT

This experiment was carried out to develop the production of specific yolk antibody from laying hens immunized with antigens from *Salmonella enteritidis*. Antigenic protein isolated from the flagella of *Salmonella enteritidis*, determined by SDS-PAGE, was pure and has a molecular mass of approximately 54.6 kDa.

It was observed that the antibody titers both in egg yolk and serum were performed at 2 weeks after immunization with flagella antigen to the laying hen. And the level was increased gradually to 6 weeks after immunization. At the time of 6 weeks, the antibody titer of yolk showed higher than that of serum. According to the results of specificity test (ELISA), the yolk antibody did not react with different bacterial strains (*S. choleraesuis*, ETEC K12:K99, K88, 987P), but reacted only with *S. enteritidis* strain.

The contents of immunoglobulin (IgY) in an egg yolk was 106mg approximately. By the isolation procedure of IgY from the egg yolk, 88.3 percent of IgY content was recovered in this study.

(key words: yolk antibody, *Salmonella enteritidis*, flagella protein, ELISA)

서 론

세균 감염 중 살모넬라증은 아직도 세계 전 지역에 문제시 되고 있다(Foulaki 등, 1989). 가금 파라티프스(paratyphoid)의 원인균은 *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*)와 *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) 등이며, 주로 어린 병아리에서 문제가 된다.

*S. enteritidis*에 감염된 성계의 경우는 대부분이 보균하고 있고 난을 통하여 그 원인균이 사람에게도 감염되어 장염, 식중독을 일으킨다(Altekruse 등, 1993; Henzler 등, 1994). 최근 우리 나라에서도 가금 살모넬라증 문제가 심각하게 대두되고 있으며 양계산업에 경제적으로 커다란 손실을 초래하고 있는 실정이다.

살모넬라 균체의 편모(flagella : H-antigen)는 숙주세포에 부착성이 있는 병원성 인자로서 특성이 알려

* 본 연구는 단국대학교 대학연구비 지원으로 수행되었음.

져 있다(Ada 등, 1963; Fey 등, 1975; Lackman 등, 1990). 또한 편모에 의한 균주의 운동성(mobility)으로 장관, 장내 상피세포의 침투를 가능케 하여 각종 질병을 유발시킨다(Lee 등, 1990; Jones 등, 1992).

이를 위한 효과적인 백신과 항 감염성 면역에 관한 많은 연구는 활발히 진행되고 있으나(Germanier, 1982) 살모넬라균은 현재까지 약 2,000여종 이상(Kim 등, 1991)으로 너무 많아 백신으로 예방하는 것으로는 한계가 있다. 또한 항생제를 사용해서 감염을 막아 살모넬라 음성제균이 되었을지라도 투약을 중지하면 재감염의 감수성만 증가시킨다.

최근 초유나 혈청면역글로불린을 급여함으로써 각종 질병의 예방에 매우 효과적이라는 연구가 보고되었다(Facon 등, 1993). 항혈청이나 초유, 단일클론항체를 이용한 항체의 활용은 매우 효과적이거나 다량의 항체를 얻기 위해서는 매우 많은 비용과 문제점이 발생된다(Kuhlman 등, 1988). 따라서 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 여러 선진국에서 개발되고 있다(Larsson 등, 1993; Sunwoo 등, 1996, Kim 등, 1996).

난 1개당 15ml의 난황이 분리되며, 마리 당 연간 IgY 생산량은 30~90g이 된다(Nakai 등, 1994). 난황 중의 IgY 함량은 9~25mg으로 동량의 혈청 중의 IgG 함량과 유사하다(Rose 등, 1974; Wang 등, 1986). 따라서 마리 당 난황으로부터 생산되는 항체(Specific IgY)의 생산량은 초유나 혈청의 경우보다 상대적으로 많고 또한 사육관리와 계란생산이 용이하기 때문에 난황을 이용한 항체생산은 기술적 및 양적 측면에서 많은 이점을 갖고 있다.

본 연구의 목적은 *S. enteritidis*로부터 특이 편모항원을 순수 분리하고, 이를 면역원으로 산란계에 면역시켜 특이난황 항체(Specific IgY)를 생산할 수 있는 방법을 구축하여 이를 가금 및 가축의 살모넬라증 예방 및 치료에 활용코자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 균주 배양 및 회수

Economic Innovation and Technology Canada,

Winnipeg, Canada에서 표준 균주를 분양 받아 trypticase soy broth(Difco) 1/당 100 μ l의 균주용액을 접종하여 4l로 대량 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 정치 배양하여 30분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리(3,000 \times g)한 후 균주를 회수하였다.

2. Flagella protein의 분리

Ibrahim 등(1985)의 방법을 수정·보완하여 회수된 균주를 0.15M PBS(0.02M phosphate buffer, 0.13M NaCl, pH 7.2)에 부유시킨 후 pH 2.0으로 조정하여, 30분간 교반하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리(14,000 \times g)하여 취한 상청액을 1M NaOH로 pH 7.4로 적정한 후, ammonium sulfate를 2.67M이 되도록 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 원심분리(20,000 \times g, 15min.)하여 침전물을 0.15M PBS 50ml로 녹인 후 dialysis tubing(Sigma Chemical Co.)으로 0.15M PBS에서 18시간 투석 후 새로운 0.15M PBS에서 다시 4시간 동안 투석하였다.

3. 단백질 분석

분리된 flagella protein의 농도측정은 Robert 등(1995)의 microwave BCA (bicinochonic acid) 방법을 수정·보완하여 실시하였다. 분석 시약은 BCA Protein kit (Pierce Chemical Co.)을 사용하였고, 96-well microplate(Falcon)를 이용하여 실시하였다.

4. 전기영동

분리한 *S. enteritidis*의 flagella protein은 Laemmli(1970)방법에 의해 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 실시하였다. 전기영동 장치는 Mini-Protein II Cell Kit(BIO-RAD)를 이용하였다. 전기영동은 200V에서 50분 동안 실시하였으며, gel의 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 실시하였다.

5. 항체 생산

1) 공시동물 및 시험장소

항체 생산에 사용된 동물은 산란을 시작한 36주령의

ISA-brown계의 산란계 15수를 사용하였으며 사육은 단국대학교 동물자원과학과 동물 사육실에서 수행하였다.

2) 면역방법

분리한 *S. enteritidis*의 flagella protein(200 μ g/ml)과 Freund's complete adjuvant(Sigma Chemical Co.)를 각각 동량을 혼합하여 유화시켰다. 이 유화액 1ml를 산란계의 흉근에 각각 0.25ml씩 4곳에 근육 주사하여 1차 접종하였으며, Booster injection은 1차 접종 후 2주 간격으로 실시하였으며 면역항원은 Freund's incomplete adjuvant(Gibco)로 유화하여 1차 접종과 동일한 방법으로 1998년 9월 16일부터 1998년 12월 9일까지 12주 동안 실시하였다.

3) 혈액채취 및 난 회수

혈액은 익하정맥(翼下靜脈)에서 2주 간격으로 채취하여 혈청을 분리한 후 -20°C 에 보관하여 각종 실험 측정에 이용하였다. 난은 매일 회수하여 8°C 에 저장하여 실험에 이용하였다.

4) 난황 항체(Egg yolk antibody; IgY) 혼합물의 분리

난황은 Kim 등(1997)의 방법에 의거하여 분리하였다. 면역접종한 산란계로부터 생산된 난을 채집하여 난황을 분리 후 증류수(pH 5.0)로 10배 희석하였다. 희석된 난황용액을 pH 5.0으로 조정 후 -20°C 에서 하룻밤 동안 동결하였다. 동결된 난황을 실온에서 해동시킨 후 30분간 15°C 에서 원심분리(10,000 \times g)하여 상청액만 수거하였다. 상청액을 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 난황단백분획을 분리하였다. 그리고 분리된 난황단백분획은 IgY농도, 항체가 측정 및 특이성 검사의 시료로 이용하였으며 일부는 냉동건조하여 보관하였다.

6. 항체가 측정과 *S. enteritidis* 항체의 특이성 검사

1) 항체가 측정

S. enteritidis 편모항원에 대한 항체형성 조사는 en-

zyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 실시하였다. Flagella protein(1.8mg/ml)을 5 μ g/ml이 되도록 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)로 희석하여 microplate (Microtest III flexible Assay plate; Falcon 3991)에 4°C 에서 하룻밤 동안 피복하였다. 피복이 완료된 plate를 세척용액(0.02M phosphate buffer, 0.13M NaCl, pH 7.2 containing 0.05% tween 20)으로 3회 세척한 후 5% 탈지유 용액(pH 7.3, Difco)으로 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 난황과 혈청은 5% 탈지유 용액과 PBST (PBS containing 0.05% Tween-20)를 동량으로 섞은 희석 용액으로 2,000배부터 1,458,000배 까지 3배수로 희석한 후 37°C 에서 2시간 반응시켰다. 2차항체는 alkaline phosphate-conjugated AffiniPure rabbit anti-chicken IgY(IgG) (Jackson, USA)를 5,000배로 희석하여 37°C 에서 2시간 반응시켰다. 기질용액으로는 phosphate substrate tablets(*p*-nitrophenyl phosphate, Sigma-104)을 10% diethanolamine (containing 0.5mM MgCl_2 pH 9.8)에 녹인 용액을 사용하여 15분간 효소와 반응시켰다. 각 과정 중 plate의 세척은 6회씩 실시하였다. 반응억제제는 5M NaOH를 사용하였으며 microplate reader(Molecular Devices ;E Max)를 이용하여 405 nm에서 항체가를 측정하였다.

2) 생산된 *S. enteritidis* 항체의 특이성 검사

S. enteritidis 편모항원을 면역접종한 산란계의 혈청 및 난황에 형성된 항체의 특이성을 조사하기 위해 *E. coli*(K12:K99, K88a, 987P)섭모(pili)항원과 *S. choleraesuis* 편모항원을 이용하여 반응 유무를 ELISA법으로 실시하였다. 사용된 buffer 및 용액은 항체가 측정에 이용했던 재료들을 사용하였고, plate는 Microtest III flexible Assay plate(Falcon 3991)를 사용하였다. K12:K99, 987P, K88a 섭모와 *S. choleraesuis* 편모 항원이 피복된 plate에 산란계 항혈청과 난황항체를 각각 50,000배 희석하여 반응시킨 후, 항체가 측정에 이용했던 방법과 동일한 방법으로 실시하였다.

7. 난황 항체(IgY)의 농도 검사

난황항체의 농도 검사는 Mancini 등(1965)의 방법을 수정·보완하여 single radial immunodiffusion (SRID) 방법으로 실시하였다. Rabbit anti-chicken IgY를 barbital buffer(50mM sodium barbital, 10mM barbital, pH 8.6)에 혼합한 용액 A를 항온수조에서 56℃로 가열하였다. 9.2ml의 barbital buffer와 0.8ml의 0.35%(wt/vol) sodium azide에 agarose 210mg을 가한 용액 B를 microwave oven에서 agarose가 완전히 녹을 때까지 가열한 후 항온수조(56℃)에서 방치하였다. 용액 A와 B가 56℃로 평형을 이룰 때 두 용액을 잘 혼합한 후 SRID glass plate에 분주하였다. 시료(난황과 난황단백분획)와 chicken IgY standards(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/ml)를 직경이 2.5mm인 well에 각각 분주하여 습기가 있는 실온 부화기에서 7시간 동안 반응시켰다. 농도의 측정은 항원항체가 반응한 면적의 직경을 측정함으로써 실시하였다.

결과 및 고찰

1. Flagella protein의 순수분리

S. enteritidis 균주에서 분리한 flagella protein의 순도(純度)를 조사하기 위하여 SDS-PAGE법에 의거 전기영동을 실시한 결과는 Figure 1에 제시한 바와 같다.

S. enteritidis 균주를 60℃ 하에서 30분간 열처리 후 균질화 한 균체용액(lane A)과 이 용액을 산 처리(HCl) 한 후 원심분리하여 얻은 상청액(lane B), 그리고 산처리된 상청액을 다시 염 처리(ammonium sulfate) 하여 얻은 용액(lane C)의 밴드 형성 결과를 비교해 보면, A 용액은 4개 이상의 밴드로 형성되었고, 산처리한 용액(B)과 산처리 및 염처리를 한 용액(C)에서는 하나의 밴드만 나타났다. 이 결과에서 균체용액을 산처리하여 원심분리하면(lane B) 순수한 flagella protein을 분리할 수 있는 것으로 판명되었으며, 산처리 용액(B)에 염을 추가적으로 처리하여도 산처리에 의해 분리된 flagella protein의 순도와 동일한 것으로 판명되었다.

본 연구에서 주 밴드는 54.6 kDa 위치에서 형성되었으며 이 분자량은 Kodoh와 Hotani (51~57 kDa,

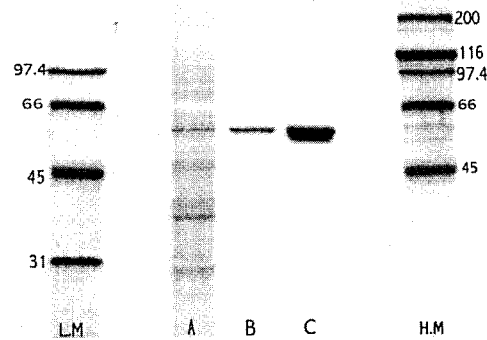


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of *S. enteritidis* flagellin isolated from *S. enteritidis* on 10% polyacrylamide gel. L.M : Low molecular range marker A : Whole cell, B : Before ammonium sulfate treatment, C : Purified *S. enteritidis* flagellin, H.M : High molecular range marker.

1974)와 Ibrahim 등이 flagella protein의 분자량을 보고한 결과(47.7~58.3 kDa, 1985)와 일치하였다. 따라서 본 결과에서 나타난 주 밴드는 분자량이 약 55kDa인 순수 flagella protein으로 판명되었다.

2. *S. enteritidis* 편모항원에 대한 면역반응

*S. enteritidis*에서 분리한 순수 편모항원을 산란계에 면역한 후, 혈청중 주별 면역반응 변화상을 보면, 면역 후 2주 경부터 항체가 높게 형성되기 시작하여 4주 경에는 급격히 증가하여 6주경에는 최고의 항체가(antibody titre; 190,000)를 형성한 후 12주까지 높은 수준을 유지하였다. 난황 중에 형성된 항체 수준도 면역 후 2주 경부터 점진적으로 시작되어 4주 이후부터는 혈청 항체가의 주별 변화상과 유사하였다(Fig. 2).

한편, 면역 6주 이후부터 난황항체가의 수준은 혈청 항체가보다 높아지는 현상을 보였으며 이 현상은 12주까지 유지되었다. 이 현상은 면역 직후 혈중에 형성된 항체가 난황으로 이전되어 축적됨으로써 항체가의 수준이 4~6주경 이후부터는 혈액 중 보다 난황 내에서 더욱 높게 나타나는 것으로 추정된다. 본 연구의 결과는 Bar-Joseph 등(1980)과 Shimizu 등(1988)의 연

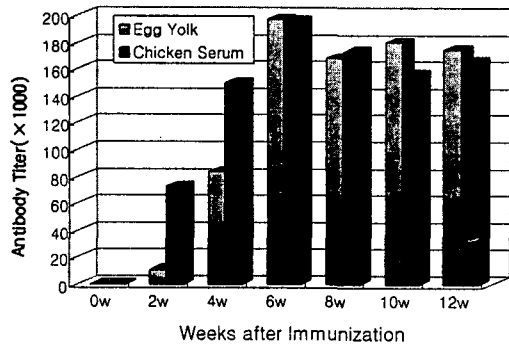


Fig. 2. Developmental changes of antibody titer after immunization.

구에서 혈액 중에 형성된 항체가 몇 주 후에 난황으로 이전된다는 연구결과를 확인시키는 것으로 나타났다.

3. 난황 항체의 특이성 검사

생산된 난황 항체 및 혈청항체의 항원특이성 검사는 ELISA법에 의거 실시하였다. 비교검사 균주로 *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *E. coli* K88a, *E. coli* K12:K99와 *E. coli* 987P의 편모항원 및 섬모항원을 사용하였다. 난황 항체 및 혈청항체를 각각 50,000배로 희석하여 반응시킨 결과 *S. enteritidis* 항원에서는 강한 결합반응(1:200,000)을 보였으며, *S. choleraesuis* 항원에는 매우 미약한 반응(1:50,000)을 보였다. 그러나 각종 *E. coli* 균체항원(*E. coli* K88a, *E. coli* K12:K99와 *E. coli* 987P)과는 반응이 전혀 없는 것으로 나타났다(Table 1).

본 연구에서 생산된 난황 항체는 50,000이상 희석하여 사용할 경우, *S. enteritidis* 항원에만 특이적으로 반응하는 특이항체로 판명되었다.

4. 난황 중 특이항체(IgY)의 함량

면역된 계란의 난황 중 *S. enteritidis* 항원에 대한 특이항체(IgY)의 농도는 8.9 mg/ml 이었으며 계란 한 개(난황 : 13.5 ml)당 IgY의 함량은 약 120 mg 이었다. 난황으로부터 산처리하여 분리 회수한 항체단백분획 중의 IgY 함량은 106 mg/egg 로서 특이항체의 회수율은 88.3 %로서 매우 높게 나타났다(Table 2).

Table 1. Specificity of anti-*S. enteritidis* antibody of chicken serum and yolk with the antigen of the different bacteria by ELISA.

Antigen	Host antibody ^a	
	Egg yolk	Chicken serum
<i>S. enteritidis</i> *	+++ ^b	+++
<i>S. choleraesuis</i> *	±	±
<i>E. coli</i> K12:K99 [†]	-	-
<i>E. coli</i> K88+*	-	-
<i>E. coli</i> 987p [†]	-	-

^a Host antibodies were diluted to 1:50,000.

^b Range of titer : - : 0, ± : below 50,000, +++ : over 200,000.

* Animal Health Centre, Veterinary Services Branch, Manitoba Agriculture, MB, Canada.

[†] *E. coli* reference centre, the Pennsylvania State University, USA.

Nakai 등(1994)은 계란 1개당 15 ml의 난황이 분리되며 마리당 연간 IgY 생산량은 30g~90g으로 추정하였고, 난황의 IgY 농도는 9~25 mg/ml으로 이 수준은 산란계 혈액 중 IgG의 농도와 유사하다고 Rose 등(1974)과 Wang 등(1986)은 보고한 바 있다. 본 연구의 결과도 상기 연구자들과 실험대상 균주는 다르지만 항체생산 수준은 동일한 범위에 있는 것으로 판명되었다.

따라서 특이항체 생산의 기존방법인 반복채혈 등 조제과정이 복잡한 혈청항체의 생산방법보다 산란계로부터 생산된 면역계란의 난황에서 항체를 분리한다면 더욱 다량의 특이항체를 간편하게 생산할 수 있을 것

Table 2. The recovery rates of IgY content in an egg yolk after acidic treatment

Items	Treatment		Recovery rate(%)
	before	after	
Initial volume of egg yolk ^a , ml	13.5± 2.7	10.8±23.5	
IgY content, mg	120±12.9	106± 7.9	88.3

^a Egg yolk was diluted with 9 volume of distilled water

으로 판단된다.

적 요

가금 및 가축의 살모넬라증을 일으키는 *S. enteritidis*에서 편모항원을 순수분리하고 이를 면역원으로 산란계에 면역하여 난황 중에 형성된 항체와 혈청간에 면역 반응을 조사하고 생산된 *S. enteritidis*에 대한 특이난황 항체의 특이성 검사와 항체회수를 검사를 실시한 결과는 다음과 같다.

1. *S. enteritidis*에서 순수 분리한 flagella protein의 분자량은 54.6kDa으로 나타났다.
2. 산란계의 혈청중 항체가 형성은 면역 후 2주경부터 급격히 증가하기 시작하여 6주경에 최고의 항체가 수준에 도달하였다. 반면에 난황중 항체가 는 면역 후 4주경부터 급격히 증가하기 시작하여 6주경에 혈청항체가 수준과 동일하게 도달되며, 10주 이후에는 혈청항체가 수준보다 높게 형성되어 일정한 수준을 유지하였다.
3. *S. enteritidis*의 flagella protein을 면역원으로 산란계에 면역하여 생산된 난황항체는 주로 *S. enteritidis* 균주에서만 특이적으로 반응하며 *E. coli* (K12:K99, K88+, 987P) 균체에서는 반응이 전혀 없는 것으로 나타났다.
4. 한개의 난으로부터 분리한 IgY의 함량은 106 mg이었으며 회수율은 88.3%였다.

(색인: 난황항체, *Salmonella enteritidis*, flagella protein, ELISA)

인용문헌

- Ada GL, Nossal GJV, Pye J, Abbot A 1963 Behaviour of active bacterial antigens during the induction of the immune response. *Nature(London)* 199:1257-1262.
- Altekruse SJ, Koehler J, Hickman-Brenner F, Tauxe RV, Ferris K 1993 A comparison of *Salmonella enteritidis* phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks. *Epidemiol Infect* 110:17-22.
- Bar-Joseph M, Malkinson M 1980 Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA): A comparison of two plant viruses. *J Virol Met* 1:179-183.
- Facon M, Skura B, Nakai S 1993 Antidies to a colonization factor of human enterotoxigenic *E. coli* in cows' milk and colostrum. *Food Agric Immunol* 5:85-91.
- Fey H, Wetzstein HP 1975 Production of potent salmonella H antisera by immunization flagellae, isolated by immunosorption. *J Med Microbiol Immunol* 161:73-78.
- Foulaki K, Gruber W, Schl S 1989 Isolation and immunological characterization of a 55-kilodalton surface protein from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 57:1399-1404.
- Germanier R 1982 Development of a new oral attenuated typhoid vaccine. Pages 419-422. In L. Weinstein and B. N. Fields(ed.), *Seminars in infectious disease*, vol. 4, *Bacterial vaccines*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Henzler DJ, Ebel E, Sanders J, Kradel D, Maso J 1994 *Salmonella enteritidis* in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian Dis* 38:37-43.
- Ibrahim GF, Fleet GH, Lyons MJ, Walker RA 1985 Methods for the isolation of highly purified salmonella flagellins. *J Clin Microbiol* 22:1040-1044.
- Jones BD, Lee CA, Falkow S 1992 Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagella rotation. *Infec Immun* 60:2475-2480.
- Kim CJ, Nagaraja KB, Pomeroy BS 1991 Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am J Vet Res* 52:1069-1074.
- Kim JW, Cho SH, Koh SY, Kim C 1997 The

- isolation of pili from enterotoxigenic *E. coli* (K99) and its production of egg yolk antibody. Korean Federation of the Societies in Animal Sciences, Proceedings 130 P97040.
- Kim JW, Marquardt RR, Baidoo SK, Frohlich AA, Connor ML 1996 The use of egg yolk antibodies(IgY) to counteract diarrheal diseases in piglets. 88th Annual Meeting Abstracts 195.
- Kodoh H, Hotani H 1974 Flagella from *Escherichia coli* K12 : polymerization and molecular weight in comparison with salmonella flagellins. *Biochim Biophys Acta* 36:117-139.
- Kuhlman R, Wiedmann V, Schmidt P, Wanke R, Linckh E, Losch U 1988 Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. immunization and antibody determination. *J Vet Med B* 35: 610-616.
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 227:680-685.
- Larsson A, Balow R-M, Lindahl TL, Forsberg P-O 1993 Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry Sci* 72:1807-1812.
- Lee CA, Falkow S 1990 The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1847-1851.
- Lockman HA, Curtiss III R 1990 *Salmonella typhimurium* mutants flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect Immun*, 58:137-143.
- Mancini G, Carbonara AO, Heremans TF 1965 Immunochemical quantification of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-242.
- Nakai S, Li-chan E, Lo KV 1994 Separation of immunoglobulin from egg yolk. Egg used and processing technologies 94-105.
- Robert E.A, Rocky ST 1995 Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular Biotechnology*. Humana Press Inc. 17-24.
- Rose ME, Orlans E, Buttress N 1974 Immunoglobulin classes in the hen's egg : their segregation in yolk and white *Eur J Immunol* 4:521-523.
- Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S 1988 Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential food ingredient. *J Food Sci* 53:1360-1366.
- Sunwoo HH, Nakano T, Dixon WT, Sim JS 1996 Immuno response in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Sci* 75:342-345.
- Wang K, Hoppe CA, Datta PK, Fogelstrom A, Lee YC 1986 Identification of the major mannose-binding proteins from chicken egg yolk and chicken serum as immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9670-9674.