

살모넬라 편모 항원에 대한 난황항체(IgY)의 생산 및 특성

신순오² · 김도균² · 양시용² · 안태영³ · 김정우^{1†}

¹단국대학교 동물자원학과, ²(주)단·바이오텍 생명과학연구소, ³단국대학교 미생물학과

Production and Characterization of Egg Yolk Antibodies (IgY) against Flagella Antigen of *Salmonella* sp.

S. O. Shin², D. K. Kim², S. Y. Yang², T. Y. Ahn³ and J. W. Kim^{1†}

¹Department of Animal Resources & Science, Dankook University,

²Life Science Research Center, Danbiotech, Co.,

³Department of Microbiology, Dankook University.

ABSTRACT : Egg yolk antibodies(IgY) from laying hens immunized with antigens from *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* were produced. The Antigenic proteins isolated from those flagella of *Salmonella* sp., determined by SDS-PAGE, were pure and had a molecular mass of approximately 53.4, 51 and 54.6 kDa, respectively. The IgY titers were found at two weeks after first immunization and increased gradually to maximum of 330,000 300,000 and 440,000 respectively. According to the results of specificity test by ELISA, the IgY raised against *Salmonella* sp. were found highly specific activity levels. Concentration of *Salmonella* sp. incubated with anti-*Salmonella* sp. IgY were drastically reduced to the levels of 2.8~4.0 log CFU/ml. The contents of IgY in an egg yolk was approximately 31~33 mg/ml.

(Key words : *Salmonella* sp, flagella protein, IgY)

서 론

살모넬라 감염증의 주요 원인균으로써 *S. choleraesuis*와 *S. typhisuis*는 자돈에서(Nielsen 등, 1995), *S. dublin*은 송아지에서(House 등, 1990), *S. pullorum* 및 *S. gallinarum*은 닭에서(이 등, 1997), *S. typhimurium*과 *S. enteritidis*는 축종에 관계없이 살모넬라증을 일으키는 것으로 알려져 있다. 살모넬라 균 표면의 flagella(H-antigen)는 숙주 부착성이 있는 병원성 인자로, 이 편모에 의한 균주의 운동성(mobility)으로 장관, 장내 상피세포의 침투를 가능케 하여 각종 질병을 유발시킨다(Lockman 등, 1990).

살모넬라증에 대한 효과적인 백신과 항 감염성 면역에 관한 많은 연구들이 진행되고 있으나(Germanier, 1982) 살모넬라 균의 항혈청이 너무 많아 백신으로 예방하는 것은 한계가 있으며, 항생제 및 항균제 사용으로 살모넬라에 음성균이 되었을지라도 투약을 중지하면 재감염시 감수성이 증가된다.

Facon 등(1993)에 의하면, 초유나 혈청면역글로불린을 급여함으로써 각종 질병의 예방에 매우 효과적이라 하였다. 그러나 항혈청이나 초유, 단일클론항체를 이용한 항체의 활용은 매우 효과적이거나 다량의 항체를 얻기 위해서는 매우 많은 비용과 항체의 활용에 있어서 문제점이 발생된다(Kuhlman 등, 1988). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 특이항체를 다량으로 간편하게 생산하는 방법이 요구되고 있다. 계란을 이용한 난황항체(IgY)의 생산은 혈청 IgG보다 상대적으로 생산량이 많고 정제하기 쉬우며, 그 비용 또한 저렴할 뿐 아니라 포유동물에서는 항원성이 없거나 혹은 약한 항원이 라도 산란계에서는 특이항체 생산이 가능한 경우도 있어 산란계에 특정 항원을 면역하여 생산된 계란의 난황으로부터 면역글로불린을 추출하는 방법이 여러 연구자에 의해 개발되고 있다(Larsson 등, 1993; Sunwoo 등, 1996; 김 등, 2000). 또한 난황항체가 대장균 설사증의 예방 및 치료용 제제로서 매우 효과적인 것으로 나타났다(Yokoyama 등, 1992; Mar-

† To whom correspondence should be addressed : kijuw@ dankook.ac.kr

quardt 등, 1999; 김 등, 2000).

본 연구의 목적은 *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin* 으로부터 항원성이 강력한 편모항원을 순수 분리하고, 이를 면역원으로 산란계에 면역시켜 특이 난황항체(Specific IgY)를 생산할 수 있는 방법을 구축하여 이를 가축의 살모넬라 증 예방 및 치료에 활용코자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 균주 배양 및 회수

S. choleraesuis, *S. typhimurium*, *S. dublin*은 Animal Health Centre(Veterinary Services branch, Manitoba Agriculture, MB, Canada), KCTC(Korean Collection for Type Cultures), ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받아 trypticase soy broth(Difco)에서 37°C, 48시간동안 정치 배양 후 원심분리(3,000×g, 4°C, 20min)하여 균체를 회수하였다.

2. Flagella protein의 분리

Flagella protein의 분리 및 정제는 Ibrahim 등(1985)의 방법에 준하여 실시되었다. 회수된 균을 0.15 M PBS(pH 7.2)에 현탁시켜 pH 2.0으로 조정 한 후, 30분간 혼합한 다음 원심분리(14,000×g, 4°C, 15 min)하여 얻은 상등액을 pH 7.4로 조정 하였다. 상등액에 ammonium sulfate를 가하여 염석(최종 농도를 2.67 M)한 후 0.15 M PBS로 투석하여 단백질을 얻었다. 분리된 flagella protein을 Robert 등(1995)의 microwave BCA 방법으로 BCA Protein assay kit(Pierce Co.)를 사용하여 정량 하였다.

3. Flagella protein의 전기영동

Flagella protein은 Laemmli(1970)방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 장치는 Mini-Protein II Cell kit(BIO-RAD)를 사용하였고, 12% separating gel에서 각 lane당 5 µg의 단백질을 loading하여 200V에서 50분 동안 영동시킨 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 band를 관찰하였다.

4. 항체 생산

1) 공시동물 및 시험장소

항체 생산에 사용된 동물은 부화 후 32주령의 갈색 ISA-brown계통 산란계 30마리와 체중 2.5 kg의 New Zealand

white종의 토끼 6마리를 항체생산에 사용하였다.

2) 산란계 면역방법

분리한 *Salmonella flagella protein* 항원을 김 등(2000)의 방법으로 2주 간격으로 16주 동안 8회 산란계의 흉근에 주사 하였다.

3) 산란계 혈액채취 및 토끼 항혈청 제조

김 등(2000)의 방법에 따라 산란계 날개밑정맥(翼下靜脈)에서 2주 간격으로 혈액을 채취하여 4°C에서 하룻밤 보관 후 원심분리하여 혈중항체역가 측정에 이용하였다. 면역기간 중 계란을 매일 회수하여 8°C에 저장하여 실험에 이용하였다. 산란계 면역방법에 준하여 토끼의 항혈청을 생산하였다. 제조한 면역원을 토끼의 등과 뒷다리에 0.25 ml씩 4곳에 피하주사와 근육주사하였다. 생산된 토끼의 항혈청을 SRID(single radial immuno diffusion)에 사용하였다.

4) 난황으로부터 항체분리

김 등(2000)의 방법에 의거하여 수용성 단백분획(water-soluble protein fraction, WSF)을 분리하였다. 분리한 단백분획은 IgY의 농도와 항체역가의 측정 시료로 이용하였다. 분획의 일부를 -50°C의 동결건조기(NCFD5508; 일신엔지니어링)에 장착하여 진공상태(10 micron Hg)에서 4일간의 건조과정을 거쳐 분말화하였다.

5. 항체의 측정

1) IgY 항체역가 측정

*Salmonella flagella protein*에 대한 항체형성 조사는 김 등(2000)의 방법에 따라 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법으로 실시되었다. Carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 flagella protein을 5 µg/ml 농도로 조정 한 후 ELISA용 plate(Microtest III flexible Assay plate ; Falcon 3991)에 100 µl씩 분주한 후 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. Flagella protein이 피복 된 plate를 꺼내어 PBS-T(0.02 M phosphate buffer, 0.13 M NaCl, pH 7.2, 0.05% tween 20)로 3회 세척한 후 blocking buffer(5% skim milk, pH 7.3, Difco)를 175 µl씩 분주하여 2시간 동안 실온에 정치 시켰다. 이 후 각 과정 중 plate 세척은 6회씩 실시하였고 용액은 100 µl씩 plate에 분주 하였다. Plate 세척 후 WSF과 혈청을 blocking buffer와 PBS-T를 동량으로 섞은 희석용액에 1:2000으로 희석 후 3배수로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이 후 conjugate

[Alkaline phosphatase conjugated AffiniPure rabbit anti-chicken IgY(IgG), Jackson, Co., Phensylvania, USA]를 분주하여 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응 후, 기질은 phosphate substrate tablets(Sigma-104, USA)를 10% diethanolamine(0.5 mM Mg-Cl₂ 함유)에 녹여 사용하였으며 ELISA plate에 분주 후 실온에서 15분간 효소와 반응시켰다. 5M NaOH를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 microplate reader(Molecular Devices; E Max)를 사용하여 흡광도(optical density : O.D.)를 측정하였다.

2) 난황항체의 특이성 검사

생산된 난황항체의 항원특이성을 조사하기 위해서 항체역가 측정과 동일한 방법으로 *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin* flagella protein이 피복된 plate에 생산된 난황항체를 각각 150,000배 희석하여 항원항체 반응정도를 검사하였다.

3) Salmonella 균과 난황항체의 결합능력 조사

살모넬라균에 대한 난황항체의 결합능력을 알아보기 위하여, 10⁹ CFU/ml농도의 균주를 시험관에 분주하였다. 동결건조된 WSF은 ml당 0, 2, 4, 8 mg이 되도록 첨가한 후, 37℃에서 2시간동안 진탕배양(60 rpm/min)후 60℃에서 30분간 열처리하였다. 전처리가 끝난 WSF과 항원결합능력의 조사는 Kim 등 (1999)의 방법에 준하여 competitive sandwich ELISA 방법으로 실시되었다. 2차 항체는 토끼에게 면역하여 생성된 *Salmonella* flagellin에 대한 항혈청(1:2,000)과 AP-Donkey anti-rabbit IgG(Jackson, 1:1,250)를 혼합하여, 2시간 전에 미리 37℃에서 반응시킨 후 사용하였다. 세척 후 phosphate substrate tablets(Sigma-10⁴)를 10% diethanolamine(0.5 mM MgCl₂ 함유)에 녹인 용액을 기질로 사용하여 실온에서 15분간 효소와 반응시켰다. 이 후 5M NaOH를 넣어 반응을 중지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 난황항체(IgY)의 농도 검사

실험기간 중 항체역가가 최고 수준에 도달한 계란으로부터 WSF를 분리하여 동결건조하였고, 난황 항체의 농도 검사를 Mancini 등(1965)의 방법에 준하여 single radial immunodiffusion(SRID)방법으로 실시하였다.

결 과

1. Flagella protein의 순수분리

S. choleraesuis, *S. typhimurium*, *S. dublin* 균주에서 분리한 flagella protein을 SDS-PAGE를 실시한 결과, flagella protein의 주 단백질은 각각 53.4, 51, 54.6 kDa에서 나타났다(Fig. 1).

2. Flagella protein에 대한 산란계의 면역반응

살모넬라 균주에서 분리한 flagella protein을 근육 접종한 산란계의 주별 혈청항체와 난황항체의 수준은 Fig. 2에 나타난 바와 같다. *S. choleraesuis*(Fig. 2a)와 *S. typhimurium*(Fig. 2b), *S. dublin*(Fig. 2c) 모두 면역 후 2주 경부터 항체가 생성되기 시작하여 4주 경부터 급격히 증가하였다. 난황항체역가는 *S. choleraesuis*의 경우 면역 후 10주 경에 이르러 최고 수준(titer; 330,000)에 이른 후 일정수준을 유지하는 경향을 보였으나, *S. typhimurium*(Fig. 2b)의 경우에는 12주에 최고 수준(titer; 300,000)에 올라 이를 유지하였다. *S. dublin*의 경우 16주 경에 최고 수준(titer; 440,000)에 도달하였다. 면역 후 8주에서 10주 이후부터는 난황항체역가의 수준이 혈청항체역가보다 높아지거나 유사한 수준으로 증가하는 경향을 보였다. 균주 별로 항체역가의 변화상은 달랐으나, 항체가 혈청에서 먼저 형성된 뒤 이어 난황에서 항체가 형성되는 경향을 나타내었다.

3. 난황 항체의 특이성 검사

생산된 난황 항체의 특이성 검사는 ELISA법을 사용하여 실시되었다. 비교검사 균주로 *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*의 flagella protein을 사용하였다. Flagella protein에 대해 생산된 난황항체를 각각 150,000배로 희석하여 각 균주

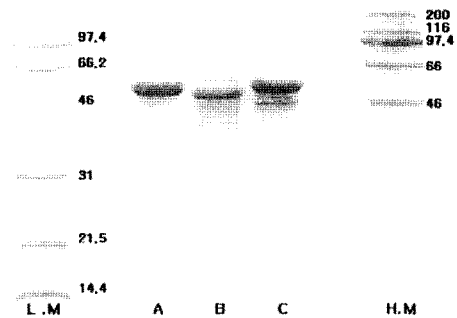
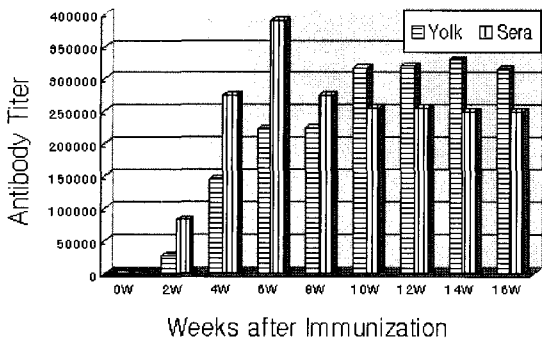
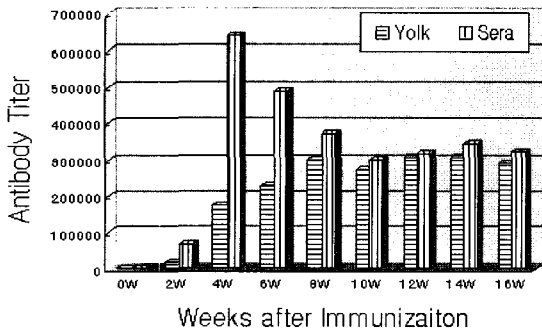


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of *Salmonella* flagella protein isolated from *Salmonella* sp. on 12% acrylamide gel.

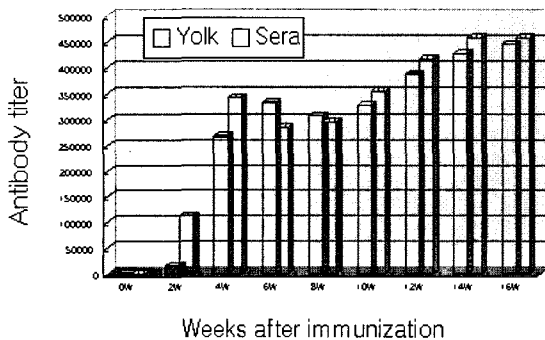
- L.M: Low range marker
- A: *S. choleraesuis* flagella protein
- B: *S. typhimurium* flagella protein
- C: *S. dublin* flagella protein
- H.M: High range marker



(a) *S. choleraesuis*



(b) *S. typhimurium*



(c) *S. dublin*

Fig. 2. Antibody titer with time after immunization.

들의 flagella protein과 반응시킨 결과, 생산된 항체는 해당 flagella protein에서만 반응하였다(Table 1).

4. 난황 중 특이항체(IgY)의 함량

면역집중한 난황 1 ml의 단백질 함량과 IgY 함량은 각각 약 32 mg(31 mg~32 mg)과 약 8.6 mg(8.5 mg~8.9 mg)으로, IgY 함량은 단백질 함량의 27%를 차지하는 것으로 나타났다. 동결건조 이후의 난황항체의 항체역가는 동결건조 전 항체역가의 약 97% 수준으로서 동결건조에 따른 특이항체의 역가는 변화가 거의 없었다(Table 2).

Table 1. Specificity of egg yolk antibody against antigens of different strains

Antigen	Host antibody		
	Egg yolk		
	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>
<i>S. choleraesuis</i> ^c	+ ^b	-	-
<i>S. typhimurium</i> ^d	-	+	-
<i>S. dublin</i> ^e	-	-	+

^a Host antibodies were diluted to 1:150,000.

^b Range of titer; - : below 150,000 , +: over 150,000.

^c Animal Health Centre, Veterinary Services branch, Manitoba Agriculture, MB, Canada.

^d KCTC2515.

^e ATCC15480.

Table 2. Recovery of egg yolk antibody after freeze drying

Treatment	Strains	Titers
Before freeze drying	<i>S. choleraesuis</i>	160,000(100%)
	<i>S. typhimurium</i>	300,000(100%)
	<i>S. dublin</i>	200,000(100%)
After freeze drying	<i>S. choleraesuis</i>	155,000(96.9%)
	<i>S. typhimurium</i>	290,000(96.7%)
	<i>S. dublin</i>	195,000(97.5%)

Table 3. Effect of IgY addition to culture medium on *Salmonella* cell concentrations¹

IgY (mg/ml) added	Cell (log CFU/ml)		
	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. dublin</i>
0	9.3	9.1	9.5
2	5.4	5.7	6.6
4	5.2	5.5	6.6

¹ Culture conditions: 37°C, 2 hr, 60 rpm/min.

5. 난황항체와 *Salmonella* sp.의 결합능력

Kim 등 (1999)의 competitive sandwich ELISA 방법으로 난황항체와 균과의 반응정도를 조사하였다. Table 3에서 나타난 바와 같이 *Salmonella* sp.이 10⁹ CFU/ml인 배양액에 2~4 mg/ml의 난황항체를 첨가하여 반응시킨 결과 균의 농도 (CFU/ml)가 ml당 10⁶ 정도로 약 1/1,000 이하로 감소하였다.

고찰

가축의 살모넬라증을 일으키는 *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*의 flagella protein을 분리하고, flagella protein을 이용하여 면역원을 제조하였다. 본 연구에서 분리한 flagella protein의 분자량은 51 kDa~54.6 kDa으로, 이는 Kodoh와 Hotani등(1974)이 보고한 51~57 kDa, Ibrahim 등(1985)이 보고한 47.7~58.3 kDa사이의 flagella protein과 일치하였다. *S. typhimurium*의 경우 flagella protein이 51 kDa 위치뿐만 아니라 57.2 kDa위치에서도 관찰되었는데(Fig. 1B) de Vries 등(1998)도 *S. typhimurium*에서는 뚜렷한 항원성을 가지는 2개의 flagella가 존재하며 서로 다른 H antigen(i 와 1,2)을 포함한다는 보고가 있었다.

한편 제조한 면역원으로 면역시킨 닭의 혈청항체역가 및 난황항체역가는 1차 접종 후 2주 후와 2차 접종 후 2주 뒤에 급격한 상승이 관찰되었고, 이후 난황항체역가가 혈청항체역가 수준에 근접하거나 오히려 높아지는 경향을 보였다. 이러한 현상은 면역 직후 혈액내에 형성된 항체가 난황으로 이전되어 축적됨으로써 나타나는 현상으로 추정되며 이 결과는 Bar-Joseph 등(1980)과 Shimizu 등(1988)의 연구에서 혈액 중에 형성된 항체가 몇 주 후에 난황으로 이전된다는 연구결과를 확인시키는 것이었다.

김 등(2000)에 의하면 대장균 K99 섬모항원을 면역하여 생산한 난황항체의 특이성 조사를 위해 K88 및 K99 대장균과 987P 대장균의 섬모항원과 결합반응을 실시해 본 결과 항체를 20,000배 이상 희석할 경우 K99의 섬모항원에만 특이적으로 반응한다고 하였으나, 본 연구에서는 150,000배 이상 희석해야 특이성이 나타났는데, 이는 본 실험에서 이용한 살모넬라 균주간의 항원성분이 유사하거나 유사한 항원결정기(common epitope)를 공유하기 때문인 것으로 추정된다.

또한 생산된 난황항체의 체내에서의 효과를 간접적으로 알아보기 위하여 *in vitro*에서 살모넬라균과 동결건조한 난황항체분말의 반응정도를 ELISA를 이용하여 실시한 결과 생산된 난황항체(IgY) 2~4 mg/ml을 첨가 시 농도가 10^9 CFU/ml인 *Salmonella* sp.를 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml으로 감소시킬 수 있는 억제력을 가진 것으로 나타났다. 이러한 난황항체의 중화효과를 볼 때 생산된 난황항체는 살모넬라증 예방 및 치료제로서의 가능성을 가진 것으로 파악된다.

그러나 난황항체(IgY)의 첨가수준을 높여도 균의 농도 감소에 대한 현저한 차이는 없었는데 이는 Kim 등 (1999)의 competitive sandwich ELISA 방법에 대한 결과에서 보고한 바와 같이 측정의 민감도 한계범위가 10^5 CFU/ml 이상이기 때문에 10^4 CFU/ml 이하 수준에서의 차이 비교가 불가능하기 때문인 것으로 판명되었다.

Nakai 등(1994)은 계란 1개당 15 ml의 난황이 분리되며 마리 당 연간 IgY생산량은 30~90 g으로 추정하였고, Rose 등(1974)과 Wang 등(1986)은 난황의 IgY 농도는 9~25 mg/ml으로 이 수준은 산란계 혈액 중 IgG의 농도와 유사하다고 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 다량의 특이항체를 간편하게 생산할 수 있으며 난황항체분말 자체가 영양소와 항체로서의 두 가지 기능을 동시에 갖는 측면에서 사료 첨가제로서 이 면역난황을 용이하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

1. *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*에서 순수 분리한 flagella protein의 분자량은 각각 53.4 kDa, 51 kDa, 54.6 kDa으로 나타났다.
2. 산란계의 혈청 중 항체역가 수준은 면역 후 2주경 부터 급격히 증가하기 시작하였고 난황 중 항체역가의 수준은 4 주경 부터 급격히 증가하기 시작하였다. 6주와 8 주경 이 후 부터는 난황항체역가가 혈청 항체역가보다 높은 수준을 유지하거나 계속 증가하였다.
3. *Salmonella* flagella protein을 면역원으로 산란계에 면역하여 생산된 난황항체는 150,000배 희석 시 각각의 *Salmonella* 균주에서 특이적으로 각각의 항원에 반응하였다.
4. 난황 1 ml당 IgY의 함량은 약 31 mg~33 mg이었으며, IgY의 함량은 단백질 함량의 약 27%를 차지하는 것으로 나타났다.
5. 실험실조건하에서 난황항체의 항원결합능력을 조사한 결과 동결건조한 WSF을 2~4 mg/ml첨가 시 균체의 농도가 10^9 CFU/ml에서 $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml로 급격하게 감소하였다.

인용문헌

de vries N, Zwaagstra KA, Huis in't Veld JHJ, van Knapen F, van Zifderveld FG, Kusters JG 1998 Production of mono-

- clonal antibodies specific for the i and 1,2 flagella antigens of *Salmonella typhimurium* and characterization of their respective epitopes. *Appl Environ Microbiol* 64:5033-5038.
- Facon M, Skura B, Nakai S 1993 Antibodies to a colonization factor of human enterotoxigenic *E. coli* in cow' milk and colostrum. *Food Agric Immunol* 5:85-91.
- Germanier R 1982 Development of a new oral attenuated typhoid vaccine. Pages 419-422. In L Weinstein and BN Fields(ed.), *Seminars in infectious disease*, vol 4 Bacterial vaccines Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- House JK, Smith BF Dilling GW 1993 Enzyme-Linked immunosorbent assay for serological detection of *Salmonella dublin* carriers on a large dairy. *Am J Vet Res* 54:1391-1399.
- Ibrahim GF, Fleet GH, Lyons MJ, Walker RA 1985 Methods for the isolation of highly purified *Salmonella flagellins*. *J Clin Microbiol* 22:1040-1044.
- Kim JW, Jin LZ, Cho SH Marquardt RR 1999 Use of chicken egg-yolk antibodies against K88+ fimbrial antigen for quantitative analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88+ by a sandwich ELISA. *J Sci Agric* 79 : 1513 -1518.
- Kodoh H, Hotani H 1974 Flagella from *Escherichia coli* K12 : polymerization and molecular weight in comparison with *Salmonella flagellins*. *Bichim 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 RM, Lindahl TL, Forsberg PO 1993 Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review *Poultry Sci* 72:1807-1812.
- 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, Carbonora AO, Heremans TF 1965 Immunochemical quantification of antigen by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-242.
- Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK 1999 Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immun & Med Microbiology* 23:283-288.
- Nakai S, Li-chan E, Lo KV 1994 Separation of immunoglobulin from egg yolk. Egg used and processing technologies. CAB International. UK p.94-105.
- Nielsen B, Baggesen D, Bager F 1995 The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary Microbiology* 47:205-218.
- Otani H, Matsumoto K, Saeki A, Hosono A 1991 Comparative studies on properties of hen egg yolk IgY and rabbit serum IgG antibodies. *Lebensm - Wiss u-Techno* 24:152-158.
- Robert EA, Rocky ST 1995 Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular Biotechnology Humana Press Inc. USA* 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.
- Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R 1992 Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 60:998-1007.
- 김정우 1998 *Salmonella enteritidis*의 편모항원에 대한 난황항체의 생산. *한국가금학회지* 25:161-167.
- 김정우 김도균 김 철 2000 장관독성 대장균 K99(F5)의 섬모항원에 대한 특이 난황항체의 생산. *한국동물자원과학회지* 42:371-378.
- 이희수 김순재 김기석 모인필 김태중 1997 국내분리주 *Salmonella gallinarum*의 닭에 대한 병원성. *대한수의학회지* 37:569-576.