

ПРОТОКОЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ, ПОЛЕЗНЫЕ МОДЕЛИ, ПРОГРАММЫ И СЕРВИСЫ**ВЫБОР НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО ПРОТОКОЛА ВЫДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ Y ИЗ ЖЕЛТКА КУРИНОГО ЯЙЦА***В.А. Ахметзянов, О.В. Чибискова, Е.Ф. Колесанова**¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

Проведена сравнительная характеристика четырёх протоколов выделения и очистки иммуноглобулинов Y из желтка куриного яйца и выбран оптимальный из них, с точки зрения чистоты и выхода конечного препарата белка. Были апробированы следующие протоколы: 1) трехступенчатая обработка субстанции яичного желтка каприловой кислотой, 2) делипидизация декстрансульфатом с последующим высаливанием иммуноглобулинов Y сульфатом натрия, 3) удаление липидов при разбавлении подкисленной водой с последующим высаливанием иммуноглобулинов сульфатом натрия и 4) очистка антител с применением замораживания-оттаивания яичного желтка. Выходы по белку оценивали по количеству общего белка в конечных препаратах иммуноглобулинов, а чистоту – методом электрофореза в денатурирующих (восстанавливающих и невосстанавливающих) условиях. По соотношению выхода белка и чистоты препарата иммуноглобулинов оптимальным был признан протокол выделения с удалением липидов при разбавлении подкисленной водой с последующим высаливанием иммуноглобулинов Y сульфатом натрия. Данный протокол может быть использован как для подготовки препарата иммуноглобулинов Y для последующей аффинной очистки специфических антител, так и для получения препаратов иммуноглобулинов Y в качестве фармацевтических препаратов.

Ключевые слова: иммуноглобулины Y, выделение и очистка, желток куриного яйца, делипидизация, осаждение сульфатом натрия, электрофорез в ПААГ

DOI: 10.18097/BMCRM00179**ВВЕДЕНИЕ**

Имуноглобулин Y (IgY) – главный защитный компонент куриного яйца, переходящий в желток из плазмы крови курицы и оберегающий потомство от патогенов. Образующиеся при иммунизации кур специфические к антигенам антитела секретируются в желток яйца, и таким образом иммунизированная курица-несушка становится фактически фабрикой по производству специфических антител [1]. Как и иммуноглобулины лабораторных животных, относящихся к млекопитающим, IgY используют в качестве аналитических инструментов при выявлении специфических антигенов или содержащих эти антигены биообъектов, при картировании антигенных детерминант [2-8]. Преимуществами IgY в этом качестве являются их более высокая стабильность [9], простота очистки, высокие выходы при наработке и выделении и, соответственно, более низкая стоимость производства антител [10-18], возможность получения антител к антигенам, консервативным для млекопитающих [19]. Более 30 лет препараты специфических IgY успешно применяют при лечении инфекционных и паразитарных заболеваний у сельскохозяйственных животных [20]. Известно, что IgY не связываются с белками системы комплемента и ревматоидным фактором млекопитающих, что снижает фоновые неспецифические сигналы при иммуноанализах и побочные реакции при лечении [2, 3]. В последние годы продемонстрирована возможность использования специфических IgY в качестве средств пассивной иммунизации для профилактики

и лечения вирусных инфекций человека [1, 21-27]. В частности, показано, что IgY, полученные из яиц кур, иммунизированных препаратами spike-белка SARS-CoV2 либо его рецептор-связывающего домена, проявляют вируснейтрализующую активность [25]. Один из таких препаратов проходит доклинические исследования [26]; обсуждается возможность применения специфических IgY для пассивной иммунопрофилактики COVID-19 [23, 26]. Также получены препараты специфических IgY и их scFv-фрагментов, пригодные для использования в диагностических иммунотест-системах для определения присутствия высококонсервативного нуклеокапсидного белка SARS-CoV2 в биологическом материале [6, 7].

Однако приведенные в этих статьях протоколы получения препаратов IgY – явно не оптимальные способы с довольно низкими выходами IgY, загрязненными заметными количествами примесных белков. Сами авторы указывают на эти недостатки [25]. Таким образом, выбор оптимального протокола выделения IgY из яичного желтка является актуальной задачей, особенно учитывая возможное применение IgY в качестве фармацевтических препаратов, в которых иммуноглобулины должны быть свободны от токсичных и вызывающих аллергию примесей.

Для получения препаратов IgY разработаны несколько протоколов, которые различаются способами удаления липидов и липопротеинов, составляющих основную субстанцию желтка яйца [10-18]. В некоторых работах проводилось сравнение эффективности отдельных протоколов друг с другом, однако ни в одной из них не



сравнивали друг с другом известные протоколы выделения IgY, пригодные для получения препаратов, допустимых к применению в фармацевтике.

Целью настоящей работы было сравнение таких универсальных экологических протоколов выделения IgY из куриных яиц и выбор наиболее эффективного из них по соотношению выхода белка и относительного содержания IgY в получаемом препарате.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: каприловая (октановая) кислота «ч» («ІСКЛАД», Россия), натрий хлористый («Реахим», Россия), трис-основание «ос.ч» («Химмед», Россия), соляная кислота «х.ч» («Сигма Тек», Россия), азид натрия «Extra pure», N,N'-метиленисакриламид, додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония («Acros organics», Бельгия), декстрансульфат натрия («Serva», Германия), кальций хлористый («Лаверна», Россия), натрий серноокислый «х.ч» («Спектр-хим», Россия), динатрий гидрофосфат додекагидрат «х.ч.» («Диа-М», Россия), калий дигидрофосфат («Merck», Германия); акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, глицин, кумасси бриллиантовый синий R250, смесь связанных с красителем белков с известной молекулярной массой «Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range» («BioRad Laboratories», США), глицерин («BioFroxx», Германия), бромфеноловый синий («Reanal», Венгрия), набор реагентов для определения концентрации белка «Pierce™ BCA Protein Assay Kit» («Thermo Fisher Scientific», США).

IgY выделяли из желтков яиц категории C0 производства агрофабрики «Птицефабрика Сеймовская» (Россия). Скорлупу яиц промывали мылом и раствором питьевой соды, аккуратно разбивали, желток отделяли от белка, прокатывали его по бумажному полотенцу для отделения халязиона, помещали в мерный цилиндр и протыкали желточный мешок. Если не оговорено, процессы проводили при комнатной температуре.

Выделение IgY с использованием каприловой кислоты

Выделение проводили согласно [10] с уточнением (протокол КК). К 10 мл желтка добавляли 40 мл холодной воды, доводили pH смеси до 5.0 0.1 н. HCl при перемешивании на магнитной мешалке (550 об/мин) в течение 10 мин. Далее смесь медленно перемешивали (150 об/мин) 2 ч и центрифугировали (9000 g, 4°C) 30 мин. Осадок отбрасывали, к супернатанту при перемешивании добавляли по каплям каприловую кислоту до конечной концентрации 2% (по объему), доводили pH до 5.0 0.1 н. HCl. Перемешивали ещё 30 мин и центрифугировали, как указано выше. Диск, образовавшийся в центрифужной пробирке над супернатантом, удаляли, собирали супернатант и добавляли к нему каприловую кислоту, как указано выше, до конечной концентрации 4% (по объему), с доведением pH до 5.0. Повторяли центрифугирование и добавление каприловой кислоты до конечной концентрации 6% (по объему) аналогично указанному выше. Полученный осадок удаляли центрифугированием, супернатант, содержащий IgY, титровали 1 М раствором трис-основания до pH 9.0.

Выделение IgY с использованием декстрансульфата

Выделение проводили согласно [4, 11] (протокол ДС). К 10 мл желтка добавляли 40 мл холодной воды, доводили pH смеси до 5.0 0.1 н. HCl при перемешивании на магнитной мешалке 550 об/мин в течение 10 мин. Далее получали препарат IgY, как описано в работе [11].

Выделение IgY разбавлением водой

Выделение проводили согласно работам [12, 13] (протокол РВ). К 10 мл желтка добавляли 50 мл воды, подкисленной до pH 5 0.1 н. HCl, перемешивали 30 мин на магнитной мешалке (550 об/мин) и выдерживали без перемешивания 12 ч при 4°C. Смесь центрифугировали (9000 g, 4°C) 30 мин. Осадок отбрасывали, к супернатанту добавляли при перемешивании сухой Na₂SO₄ до конечной концентрации 18% (масса/объем), инкубировали 1 ч и центрифугировали (9000 g, 4°C) 30 мин. Осадок ресуспендировали в минимальном объеме фосфатно-солевого буфера (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na-K фосфат, pH 7.4) и диализовали против двух смен по 400 объемов того же буфера.

Выделение IgY с использованием замораживания-оттаивания

Выделение проводили согласно [14] с уточнением (протокол ЗО). Желток (10 мл) замораживали при -38±2°C и выдерживали при этой температуре 32 ч, затем оттаивали его в течение ночи при 4°C. Добавляли 50 мл воды при температуре 20°C, тщательно размешивали стеклянной палочкой и гомогенизировали на льду блендером при 11000 об/мин в течение 10 с. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 9000 g и 4°C, липидный диск в верхней части центрифужной пробирки и осадок отбрасывали.

Концентрацию белка определяли с помощью цветной реакции с бицинониновой кислотой, используя готовые реагенты набора «Pierce™ BCA Protein Assay Kit»; калибровочную кривую строили по бычьему сывороточному альбумину. В растворы стандарта и препаратов IgY до добавления реагентов набора вносили додецилсульфат натрия до конечной концентрации 0.04% (масса/объем) для обеспечения полной солюбилизации остаточных липопротеинов.

Электрофорез

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) с концентрациями разделяющего и концентрирующего геля соответственно 14% и 8% (в восстанавливающих условиях в присутствии 5% 2-меркаптоэтанола) и 12% и 6% (в невосстанавливающих условиях) в присутствии 0.1% SDS в буферной системе Лэммли [28, 29]. Для электрофореза использовали систему MiniProtean («Bio-Rad Laboratories», США). В лунки геля наносили по 8 мкг препаратов IgY в 10 мкл буфера образца [28, 29]. Для определения относительной локализации IgY и его субъединиц в ПААГ калибровали гель смесью белков-маркеров «Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range» («Bio-Rad Laboratories»). Окрашивали белки в

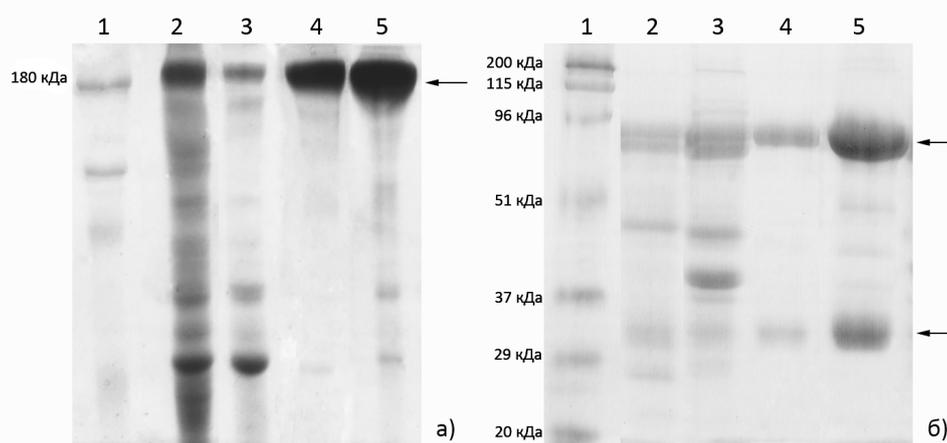


Рисунок 1. Электрофореграммы образцов антител в ПААГ: а) в невосстанавливающих условиях; б) в восстанавливающих условиях. Дорожки: 1 – смесь белков-маркёров с известными молекулярными массами (величины молекулярных масс указаны слева от полосы 1); 2 – препарат IgY, полученный по протоколу КК; 3 – препарат IgY, полученный по протоколу ЗО; 4 – препарат IgY, полученный по протоколу ДС; 5 – препарат IgY, полученный по протоколу РВ. Полосы, соответствующие IgY (а) и тяжелой и легкой цепям IgY (б), отмечены стрелками.

Таблица 1. Характеристика препаратов IgY, полученных с использованием различных протоколов

Протокол выделения	Выход общего белка из 10 мл желтка ^а , мг	Относительное содержание IgY, % по данным электрофореза в ПААГ ^а	
		В восстанавливающих условиях	В невосстанавливающих условиях
КК	114	42.9	26.3
РВ	53	86.4	81.1
ЗО	238	28.6	24.2
ДС	16	100	88.3

^аСредние величины из результатов двух независимых экспериментов (за исключением протокола ЗО, по которому повторный эксперимент не проводили).

ПААГ кумасси бриллиантовым синим R250. Интенсивность окраски полос белков после электрофореза в ПААГ определяли денситометрированием фотографий полос геля с помощью программного продукта «GelAnalyzer 19.1» [30]. Относительное содержание IgY рассчитывали как отношение интенсивности полос, соответствующих целым молекулам IgY (после электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях), или суммы интенсивностей полос субъединиц IgY (после электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях) к сумме интенсивностей полос всех белков на дорожке геля.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследованные нами протоколы выделения препаратов суммарных IgY из желтков куриных яиц различались способами удаления липидов и липопротеидов. Сравнение эффективности выделения IgY по разным протоколам проводили по количеству общего белка в конечных препаратах IgY и степени чистоты этих препаратов (относительному содержанию IgY по данным диск-электрофореза в ПААГ). На рисунке 1 показаны результаты электрофореза в ПААГ препаратов IgY, полученных с помощью исследованных нами четырех протоколов. Из рисунка 1 видно, что все полученные препараты обогащены IgY; полосы, соответствующие целым молекулам IgY

(рис. 1а) и его отдельным субъединицам (рис. 1б), преобладают на всех дорожках ПААГ.

Наиболее чистые препараты IgY были получены по протоколам ДС и РВ.

В таблице 1 представлены результаты определения количества общего белка и относительного содержания IgY в препаратах IgY, полученных по разным протоколам.

Как следует из таблицы 1, по соотношению выхода белка и чистоты препарата IgY наилучшим оказался протокол РВ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в литературе протоколы получения суммарных препаратов IgY из желтков куриных яиц различаются главным образом способами делипидизации и удаления липид-ассоциированных белков, составляющих основную долю субстанции желтка. Все протоколы можно схематически разделить на шесть групп в зависимости от используемого способа делипидизации [17]: 1) удаление каприловой кислотой путём формирования смешанных мицелл с липидами и липопротеинами [10]; 2) удаление связыванием с анионными полисахаридами (декстрансульфатом, каррагинаном, пектином) [4, 5, 11, 18]; 3) экстракция липидов и осаждение белков органическими растворителями и реагентами (хлороформом, фенолом) [15-17]; 4) удаление осаждением из подкисленного водного



Рисунок 2. Протоколы выделения иммуноглобулинов Y из желтков куриных яиц с различными способами делипидизации (схема).

раствора [12, 13]; 5) селективное осаждение липопротеинов и IgY растворами полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 разной концентрации [15]; 6) удаление липидов за счёт нарушения взаимодействия с белками при длительном замораживании и медленном оттаивании [14] (рис. 2).

Целью нашей работы был выбор наилучшего протокола получения фракции IgY из яичного желтка с точки зрения выхода продукта, его чистоты, материальных и трудовых затрат. Ещё одним критерием выбора была универсальность применения протокола, то есть возможность его использования как в научных исследованиях, так и при получении фармацевтически приемлемых препаратов; по этой причине мы изначально не рассматривали протоколы с применением органических растворителей и реагентов (протоколы групп 3 и 5). Таким образом, мы сравнивали четыре протокола, использующие четыре разных способа делипидизации: 1) с помощью обработки каприловой кислотой (протокол КК), 2) связыванием с декстран сульфатом (протокол ДС), 3) подкисление в водном растворе (протокол РВ), 4) с использованием длительного замораживания и медленного оттаивания (протокол ЗО). Ни в одной из ранее опубликованных работ не проводилось сравнение протоколов с этими четырьмя типами делипидизации. Следует отметить, что в трех из этих четырех протоколов после делипидизации IgY далее осаждали сульфатом аммония или натрия; только при обработке каприловой кислотой, как утверждали авторы протокола [10], такое осаждение не требовалось.

Полученные нами результаты сравнения четырех протоколов выделения IgY из желтка куриных яиц показывают, что наиболее эффективным с точки зрения выхода препарата и его чистоты является протокол РВ, представленный в работах [12, 13] и включающий

делипидизацию путём разведения субстанции желтка подкисленной до pH 5.0 водой и последующее осаждение IgY сульфатом натрия (рис. 1, табл. 1). В первой из них авторы применяли для осаждения IgY сульфат аммония 30% насыщения. Аналогичный протокол был использован при выделении препаратов IgY, специфичных к нуклеокапсидному белку SARS-CoV2 [2]. В работе [13] осаждали IgY сульфатом натрия (концентрация Na_2SO_4 в растворе 18% насыщения, вес/объем), тогда как в ранее описанном протоколе те же авторы использовали сульфат аммония 50% насыщения. При воспроизведении оригинального протокола при осаждении сульфатом аммония нами отмечено образование очень небольшого количества неплотного осадка, тогда как использованное в более поздней работе и в наших более ранних экспериментах осаждение IgY сульфатом натрия [4, 5] оказалось значительно более эффективным (табл. 1).

При использовании протокола ДС был также получен препарат IgY довольно высокой степени очистки, однако выход иммуноглобулинов был намного ниже, чем в протоколе РВ. При использовании остальных двух протоколов были получены препараты IgY, сильно загрязненные примесными белками, что явно осложнит последующую очистку специфичных IgY, а также не позволит применять получаемые IgY в качестве фармпрепаратов из-за присутствия потенциальных аллергенов куриного яйца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее эффективным, согласно нашим результатам, способ получения препарата IgY из желтка куриных яиц путём разбавления подкисленной водой с последующим высаливанием сульфатом натрия универсален и может применяться как в научных исследованиях, например, как

первая стадия очистки специфических поликлональных антител, далее выделяемых аффинной хроматографией, так и в фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарии. В получаемом препарате отсутствуют потенциальные токсичные примеси, а технология отличается экологичностью. Помимо эффективности выделения IgY, данный протокол отличают дешевизна используемых расходных материалов и оборудования и низкие трудозатраты.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводились эксперименты с использованием животных и биологических материалов, полученных от человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 гг.), тема № 122030100170-5.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mine, A., Kovacs-Nolan, J. (2002) Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *Journal of Medicinal Food*, **5**(3), 159–169. DOI: 10.1089/10966200260398198
- Larsson, A., Karlsson-Parra, A., & Sjöquist, J. (1991) Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clinical Chemistry*, **37**(3), 411–414.
- Larsson, A., Wejåker, P. E., Forsberg, P. O., Lindahl, T. (1992) Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *Journal of Immunological Methods*, **156**(1), 79–83. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90013-j
- Bocharova, O.V., Moshkovskij, S.A., Chertkova, R.V., Abdullaev, Z.H., Kolesanova, E.F., Dolgih, D.A., Kirpichnikov, M.P. (2002) Vvedenie biologicheskii aktivnykh fragmentov interferona-a2 i insulina v sostav iskusstvennogo belka al'bebetina vliyaet na immunogenost' itogovoj konstrukcii. *Voprosy Meditsinskoj Himii*, **48**(1), 94-102.
- Moshkovskii, S.A., Kolesanova, E.F., Archakov, A.I. (2002) Continuous Bepitope maps of cytochrome P450cam (CYP101) obtained by peptide scanning: correlation to spatial structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **398**, 269-274. DOI: 10.1006/abbi.2001.2714.
- Lu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Huang, J., Yao, M., Huang, G., Ge, Y., Zhang, P., Huang, H., Wang, Y., Li, H., Wang, W. (2020) Generation of Chicken IgY against SARS-CoV-2 Spike Protein and Epitope Mapping. *Journal of Immunology Research*, 2020, 9465398. DOI: 10.1155/2020/9465398
- Somasundaram, R., Choraria, A., Antonyamy, M. (2020) An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. *International Immunopharmacology*, **85**, 106654. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106654
- Palaniyappan, A., Das, D., Kammila, S., Suresh, M. R., Sunwoo, H. H. (2012) Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. *Poultry Science*, **91**(3), 636-642. DOI: 10.3382/ps.2011-01916
- Su Y., Sun Y., Zhai Y., Gu L., Li J., Gong L., Chang C., Yang Y. Effects of surfactants on activity and structure of egg yolk antibody. *Food and Bioproducts Processing*, **132**, 167-176. DOI: 10.1016/j.fbp.2022.01.005
- Redwan, E.M., Aljadawi, A.A., Uversky, V.N. (2021) Simple and efficient protocol for immunoglobulin Y purification from chicken egg yolk. *Poultry Science*, **100**(3), 100956. DOI: 10.1016/j.psj.2020.12.053

- Jensenius, J.C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M., Koch, C. (1981) Eggs: conveniently packaged antibodies. *Methods for purification of yolk IgG. Journal of Immunological Methods*, **46**(1), 63-68. DOI: 10.1016/0022-1759(81)90333-1
- Akita, E.M., Nakai, S. (1992) Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *Journal of Food Science*, **57**, 629-634. DOI: 10.1111/J.1365-2621.1992.TB08058.X
- Akita, E.M., Nakai, S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *Journal of Immunological Methods*, **160**(2), 207-214. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90179-b
- Wang, X., Li, J., Su, Y., Chang, C., Yang, Y. (2021) Freeze-thaw treatment assists isolation of IgY from chicken egg yolk. *Food Chemistry*, **364**, 130225. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130225
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E., van der Merwe, K. J. (1985) Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunological investigations*, **14**(4), 323-327. DOI: 10.3109/08820138509022667
- Fishman, J. B., Berg, E. A. (2018) Isolation of IgY from Chicken Eggs. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). DOI: 10.1101/pdb.prot099150
- Ren, H., Yang, W., Thirumalai, D., Zhang, X., & Schade, R. (2016) A comparative evaluation of six principal IgY antibody extraction methods. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, **44**(1), 11-20. DOI: 10.1177/026119291604400111
- Chang, H. M., Lu, T. C., Chen, C. C., Tu, Y. Y., Hwang, J. Y. (2000) Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(4), 995-999. DOI: 10.1021/jf990539k
- Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T., Hübscher, U. (1990) Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB journal*, **4**(8), 2528-2532. DOI: 10.1096/fasebj.4.8.1970792
- Pereira, E., van Tilburg, M. F., Florean, E., Guedes, M. (2019) Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, **73**, 293–303. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.05.015
- Rajesvari, S., Choraria, A., Xiao-Ying Zhang, X.-Y., Antonyamy, M. (2018) Applications of Chicken Egg Yolk Antibodies (IgY) in healthcare: A review. *Biomedical Journal of Scientific and Technology Research* **2**(1), 2161-2163. DOI: 10.26717/BJSTR.2018.02.000649
- Abbas, A. T., El-Kafrawy, S. A., Sohrab, S. S., Azhar, E. (2019) IgY antibodies for the immunoprophylaxis and therapy of respiratory infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, **15**(1), 264-275. DOI: 10.1080/21645515.2018.1514224
- Constantin, C., Neagu, M., Diana Supeanu, T., Chiurciu, V., & A Spandidos, D. (2020) IgY - turning the page toward passive immunization in COVID-19 infection (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, **20**(1), 151–158. DOI: 10.3892/etm.2020.8704
- Lyu, J., Bao, L., Shen, X., Yan, C., Zhang, C., Wei, W., Yang, Y., Li, J., Dong, J., Xiao, L., Zhou, X., Li, Y. (2021) The preparation of N-IgY targeting SARS-CoV-2 and its immunomodulation to IFN- γ production in vitro. *International Immunopharmacology*, **96**, 107797. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107797
- Aston, E.J., Wallach, M.G., Narayanan, A., Egaña-Labrin, S., Gallardo, R.A. (2022) Hyperimmunized chickens produce neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Viruses* **14**(7):1510. DOI: 10.3390/v14071510
- Agurto-Arteaga, A., Poma-Acevedo, A., Rios-Matos, D., Choque-Guevara, R., Montesinos-Millán, R., Montalván, A., Isasi-Rivas, G., Cauna-Orocollo, Y., Cauti-Mendoza, M. G., Pérez-Martínez, N., Gutiérrez-Manchay, K., Ramírez-Ortiz, I., Núñez-Fernández, D., Salgado-Bohorquez, M. I., Quiñones-García, S., Fernández Díaz, M., Guevara Sarmiento, L. A., Zimic, M., COVID-19 Working Group in Perú. (2022) Preclinical Assessment of IgY Antibodies Against Recombinant SARS-CoV-2 RBD Protein for Prophylaxis and Post-Infection Treatment of COVID-19. *Frontiers in Immunology*, **13**, 881604. DOI: 10.3389/fimmu.2022.881604
- Wallach, M. G. (2022). Opinion: The use of chicken IgY in the control of pandemics. *Frontiers in Immunology*, **13**, 954310. DOI: 10.3389/fimmu.2022.954310
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0
- Generalov, I. I., Moiseeva, A. M., Zherulik, S. V., Generalova, A. G., & Zheleznyak, N. V. (2009) Poluchenie vy'sokochishenny'x immunoglobulinov klassa g iz sy'vorotki krovi cheloveka. *Vestnik Farmacii*, **4**(46), 52-60.
- GelAnalyzer 19.1 by I. Lazar, Jr., and I. Lazar, Sr., url: www.gelanalyzer.com

Поступила: 12.09.2022
 После доработки: 10.10.2022
 Принята к публикации: 10.10.2022

SELECTION OF THE MOST EFFICIENT PROTOCOL FOR THE IMMUNOGLOBULIN Y EXTRACTION FROM HEN EGG YOLK

*V.A. Akhmetzyanov, O.V. Chibiskova, E.F. Kolesanova**

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

Four protocols of immunoglobulin Y extraction and purification from hen egg yolk were compared and the optimal one was chosen from the viewpoint of the purity and yield of the final protein preparation. The following protocols were tested: 1) three-step treatment of the yolk substance with caprylic acid; 2) delipidation with dextran-sulfate followed by sodium sulfate fractionation; 3) removal of lipids via diluting by acidified water followed by sodium sulfate fractionation and 4) purification of immunoglobulins with the use of egg yolk freezing-thawing. Protein yields were assessed as amounts of the total protein in the final immunoglobulin preparations; purity was assessed via polyacrylamide gel electrophoresis in denaturing (reducing and non-reducing) conditions. The protocol of the immunoglobulin Y extraction with the removal of lipids via diluting by acidified water followed by sodium sulfate fractionation was considered as the optimal one, with regard to the ratio between the protein yield and immunoglobulin preparation purity. This protocol can be employed both for the preparation of immunoglobulin Y samples for further affinity purifications of specific antibodies for research purposes and for the production of immunoglobulins Y as pharmaceuticals.

Key words: immunoglobulins Y, extraction and purification, hen egg yolk, delipidation, sodium sulfate precipitation, PAAG electrophoresis

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030), theme No.122030100170-5.

Received: 12.09.2022, revised: 10.10.2022, accepted: 10.10.2022