

THỬ NGHIỆM CHIẾT XUẤT IMMUNOGLOBULIN Y(IgY) TỪ LÒNG ĐÓ TRỨNG GÀ

Trần Trọng Kha, Phan Thị Ngọc Anh, Trần Thị Quỳnh Lan
Khoa Chăn nuôi Thú y, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Hai nhóm gà đẻ trứng (nhóm gà đối chứng được tiêm dung dịch nước muối sinh lý-NaCl 0,9% và nhóm gà thí nghiệm được gây miễn dịch với Bovin serum albumin - BSA), trứng thu nhận từ 2 nhóm gà này được dùng để chiết xuất IgY từ lòng đỏ bằng phương pháp sử dụng chloroform và polyethylen glycol (PEG).

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng IgY trong mẫu chiết xuất của cả hai phương pháp trước khi gây miễn dịch ở cả nhóm gà thí nghiệm và gà đối chứng đạt $592 - 883 \mu\text{g.ml}^{-1}$, hàm lượng IgY này không có sự khác biệt có ý nghĩa ($P > 0,05$) giữa 2 phương pháp chiết xuất và 2 nhóm gà thí nghiệm, đối chứng. Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu, mẫu chiết xuất bằng phương pháp chloroform ở nhóm gà tiêm BSA có hàm lượng IgY trung bình là $3903 \pm 726 \mu\text{g.ml}^{-1}$, cao hơn hàm lượng IgY chiết xuất bằng phương pháp PEG ($2937 \pm 294 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ($P < 0,05$). Hàm lượng IgY được chiết xuất bằng phương pháp chloroform từ nhóm gà tiêm BSA thì cao hơn từ nhóm gà đối chứng ($P < 0,01$) và tăng dần đến thời điểm kết thúc thí nghiệm ($6633 \pm 1166 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Ngược lại, hàm lượng IgY chiết xuất bằng phương pháp PEG thu nhận được từ nhóm gà tiêm BSA và nhóm gà đối chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa ($P > 0,05$). Kết quả kiểm tra mẫu chiết xuất bằng hai phương pháp với kỹ thuật SDS-PAGE cho thấy sự hiện diện IgY qua xác định khối lượng chuỗi nặng ($67 - 70 \text{ kDa}$) và chuỗi nhẹ (25 kDa).

Từ khóa: Immunoglobulin Y, lòng đỏ trứng, chiết xuất, polyethylene glycol, chloroform.

Testing Immunoglobulin Y (IgY) extract from chicken egg yolk

Tran Trong Kha, Phan Thi Ngoc Anh, Tran Thi Quynh Lan

SUMMARY

Eggs were collected from 2 groups of hens: group 1 was immunized by bovine serum albumin-BSA (experimental hen group) and group 2 was injected by sterile normal saline solution 0.9% (control hen group). IgY was extracted from chicken egg yolk by 2 methods: chloroform and polyethylen glycol (PEG) for both experimental and control hen groups.

One week before inoculation for the experimental and control hen groups, the content of IgY obtained by both methods was $592 - 883 \mu\text{g.ml}^{-1}$, these IgY contents were not significant difference ($P > 0.05$) between the 2 extracted methods and 2 hen groups (experimental and control groups). Two weeks after the first immunization, the content of IgY extracted by the chloroform method from the experimental hen group was $3903 \pm 726 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n = 5$) and it was higher than the content of IgY extracted by PEG method ($2937 \pm 294 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $n = 5$) ($P < 0.05$). The correlation of extracted results between the two methods was maintained to the end of the experiment, while the IgY content obtained from the experimental hen group by the chloroform method was significantly higher ($P < 0.01$) than that of the control hen group and continuously increased to $6633 \pm 1166 \mu\text{g.ml}^{-1}$ at the end of this study. Whereas, the IgY content extracted by PEG method was not significant difference between the experimental hen group and control hen group. The results of examining all the extracted samples by the SDS-PAGE technique showed the presence of heavy ($67 - 70 \text{ kDa}$) and light (25 kDa) chains according to IgY molecular weight.

Keywords: Immunoglobulin Y, egg yolk, extraction, polyethylene glycol, chloroform.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng vaccin và kháng sinh từ lâu đã được xem như giải pháp hữu hiệu trong phòng và trị bệnh trên vật nuôi. Tuy nhiên, bên cạnh những hiệu quả đã được công nhận thì tính an toàn, đề kháng kháng sinh, hiệu quả phòng ngừa không đồng nhất của vaccin cũng như chưa có vaccin trong nhiều bệnh đang là những thách thức cho ngành chăn nuôi. Nhiều nghiên cứu về các giải pháp thay thế kháng sinh với mục tiêu đem lại hiệu quả trong phòng trị bệnh nhưng vẫn bảo đảm phúc lợi động vật, không gây những tác động tiêu cực đến môi trường; cũng như giảm thiểu những tác dụng phụ không mong muốn trên động vật trong quá trình điều trị đã và đang được triển khai. Một trong những giải pháp đang cho thấy kết quả tốt là sử dụng IgY.

Hoạt tính của IgY chống lại mầm bệnh đường ruột như Enterotoxigenic *Escherichia coli* (Nasiri và cs., 2016), *Salmonella typhimurium* (Li và cs., 2016), và chống lại bào tử *Clostridium difficile* (Pizarro-Guajardo, 2017) đã được ghi nhận. Việc dùng IgY để thay thế kháng sinh trong phòng ngừa và điều trị bệnh cho vật nuôi cũng hứa hẹn sẽ góp phần làm giảm tình trạng đề kháng kháng sinh (Rahman và cs., 2013). Ngoài ra, tiềm năng ứng dụng IgY trong điều trị các bệnh do nhiễm trùng virus trên đường ruột của vật nuôi cũng đã được ghi nhận. Các nghiên cứu cho thấy IgY có thể chống lại Rotavirus nhóm A ở gia súc (Vega, 2015), virus gây dịch tiêu chảy cấp trên heo – PEDV (Lee, 2015). IgY cũng được ứng dụng trong các kỹ thuật như ELISA, miễn dịch sắc ký, Western Blot để chẩn đoán bệnh do virus, vi khuẩn, ký sinh trùng (Wang và cs., 2015; Zhang và cs., 2016; Walczak và cs., 2015; Cakir-Ko và cs., 2016).

Sử dụng chiết xuất IgY từ lòng đỏ trứng có ưu thế vì đơn giản trong thu nhận kháng thể với hàm lượng cao và giá thành rẻ hơn so với việc chiết xuất IgG từ máu động vật có vú, đồng thời kháng thể không bị tạp nhiễm những kháng thể khác như IgA hoặc IgM hình thành trong đáp ứng miễn dịch (Schade, 2001; Kumaran, 2016). Ngoài ra, hàm lượng kháng thể IgY thu được từ lòng đỏ trứng gà cũng tăng lên đáng kể theo độ

tuổi của gà đẻ trứng (Ali, 2013). Thêm vào đó, việc sử dụng IgY để thay thế cho IgG của động vật có vú cũng được Schade (1996) đề xuất nhằm giảm thiểu đau đớn gây ra bởi việc thu thập kháng thể huyết thanh trên động vật có vú. Vì vậy, việc chiết xuất và tinh sạch thành công IgY từ lòng đỏ trứng gà sẽ tạo cơ sở sản xuất nhiều loại kháng thể IgY đặc hiệu trên các loại kháng nguyên khác nhau hay được thử nghiệm lâm sàng (Suzuki và cs., 2004; Horie và cs., 2004).

Để ứng dụng được IgY thì xây dựng quy trình gây miễn dịch với mầm bệnh được xác định kết hợp quy trình chiết xuất phù hợp là điều kiện tiên quyết. Chính vì vậy, nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sản xuất kháng thể IgY ở gà mái bằng việc tạo miễn dịch với một kháng nguyên bản chất protein và so sánh khả năng chiết xuất IgY bằng hai phương pháp chloroform và polyethylene glycol (PEG) để tìm ra phương pháp tối ưu hơn. Hiệu quả của việc chiết xuất được đánh giá dựa trên hàm lượng và độ tinh sạch của IgY.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Gây miễn dịch cho gà, kiểm tra đáp ứng miễn dịch của gà
- Kiểm tra sự thay đổi nồng độ IgY sau khi gây miễn dịch: Chiết xuất IgY từ lòng đỏ trứng bằng hai phương pháp chloroform và PEG, so sánh hàm lượng IgY giữa lô miễn dịch và lô đối chứng
- Kiểm tra mẫu chiết xuất bằng SDS-PAGE: Kiểm tra sự hiện diện của protein IgY và độ tinh sạch của mẫu chiết xuất
- So sánh hiệu quả giữa hai phương pháp chiết xuất IgY: So sánh hàm lượng IgY thu được từ hai phương pháp chiết xuất.

2.2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Gây miễn dịch cho gà thí nghiệm

Sáu gà hậu bị được mua về từ trại gà đẻ trứng thương phẩm, nuôi trong lồng ở điều kiện nhiệt

độ 25°C - 32°C và kiểm soát tiểu khí hậu chuồng nuôi bằng hệ thống thông gió và bạt che mát. Gà được cho ăn thức ăn công nghiệp.

Quy trình gây miễn dịch được thực hiện dựa theo mô tả của Sunwoo và cs. (1996). Albumin huyết thanh bò (BSA, 20 mg.ml⁻¹, BioBasic Inc., Canada) được pha loãng trong dung dịch 1X muối đệm phosphate (PBS) và nhũ hóa với một thể tích tương đương của chất hỗ trợ Freund hoàn toàn (F5881, Sigma-Aldrich Inc., Mỹ) để chuẩn bị cho quá trình gây miễn dịch gà.

Gà được chia thành hai nhóm, mỗi nhóm 3 gà và được nuôi trong các lồng riêng biệt có ghi ký hiệu (A1, A2, A3: nhóm thí nghiệm và C1, C2, C3: nhóm đối chứng), gà trong nhóm thí nghiệm được gây miễn dịch ba lần. Lần gây miễn dịch đầu tiên, gà được tiêm 1 mg BSA tại 4 vị trí của cơ ức (0,25 mg BSA cho mỗi vị trí). Nhóm gà này được tiêm nhắc lại lần hai (2 tuần kể từ lần tiêm trước) và lần ba (3 tuần kể từ lần tiêm trước) bằng cách thức tương tự như lần đầu tiên. Gà ở nhóm đối chứng được tiêm dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 0,9%) trong cùng thời điểm và cách thức như nhóm gà thí nghiệm. Trứng của hai nhóm gà được thu nhận mỗi ngày trong 8 tuần liên tiếp kể từ thời điểm 1 tuần trước lần gây miễn dịch đầu tiên và trữ ở 4°C để chuẩn bị cho việc chiết xuất IgY.

2.2.2. Quy trình chiết xuất kháng thể IgY từ lòng đỏ trứng gà

Để so sánh hai quy trình chiết xuất, trứng thu nhận của từng cá thể gà trong nhóm đối chứng (không tiêm BSA) và nhóm thí nghiệm (tiêm BSA) sẽ được sử dụng song song cho mỗi quy trình với số lượng tương đương.

Phương pháp chiết xuất dùng chloroform: 15 ml lòng đỏ trứng được trộn đều với 25 ml dung dịch PBS 1X (PD100, BioBasic Inc., Canada), sau đó 20 ml chloroform (64-66-3, VN-Chemsol Co., Ltd., Việt Nam) được thêm vào và trộn trong 30 giây để được một hỗn hợp đồng nhất. Sau đó, hỗn hợp được ly

tâm ở 2.000 vòng/phút trong 30 phút. Phần dịch nổi được thu nhận để thực hiện bước kết tủa IgY.

Phương pháp chiết xuất dùng PEG 6.000 (PB0432, BioBasic Inc., Canada): 15 ml lòng đỏ trứng được trộn đều với 7,5 ml dung dịch PBS 1X, sau đó thêm vào 7,5 ml dung dịch PEG 14% và trộn trong 30 giây để được hỗn hợp đồng nhất. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở 4°C trong 15 phút (Hettich Rotina 35). Phần dịch nổi được lọc qua giấy lọc và chuyển vào một ống sạch khác để thực hiện bước kết tủa IgY.

Sau đó, IgY trong phần dịch nổi được kết tủa bằng cách thêm vào một lượng thể tích tương đương dung dịch PEG 24%, sau đó trộn đều trong 30 giây và ly tâm ở 4°C trong 15 phút (Hettich Rotina 35). Phần dịch nổi được loại bỏ và phần kết tủa được ly tâm thêm hai lần nữa để loại bỏ hoàn toàn PEG còn sót lại. Kết tủa cuối cùng được hòa tan lại trong 10 ml dung dịch PBS 1X và trữ ở 4°C.

2.2.3. Kiểm tra IgY trong mẫu chiết xuất bằng phương pháp SDS-PAGE

Sau khi chiết xuất, sự hiện diện của IgY được xác định bằng phương pháp điện di biến tính gel Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (SDS-PAGE) với nồng độ SDS của gel gom là 5% và của gel phân tách là 8%.

2.2.4. Đo hàm lượng IgY trong mẫu sau ly trích

Nồng độ IgY của tất cả các mẫu chiết xuất được xác định bằng cách sử dụng kit định lượng protein (Sigma-Aldrich Inc., Mỹ). Đường chuẩn của nồng độ protein được xây dựng dựa trên hướng dẫn của nhà sản xuất và dùng để xác định nồng độ IgY trong mẫu chiết xuất.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, xử lý thống kê bằng phần mềm Stata phiên bản 14.2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phương pháp chiết xuất

Tổng cộng 213 trứng được thu nhận trong suốt quá trình thí nghiệm và 150 trứng được dùng để chiết xuất IgY bằng hai phương pháp. Trong quá trình thí nghiệm, 30 trứng của cá thể gà C1 không đạt chất lượng nên kết quả của những trứng này bị loại trừ.

Việc chiết xuất IgY từ lòng đỏ trứng bằng phương pháp PEG được xem là kỹ thuật tiêu

chuẩn để chiết xuất IgY (Polson, 1980; Schade, 2001). Tuy nhiên, kết quả từ phương pháp này cho thấy lượng giá kháng thể thu được thấp vì có thể hơn một nửa IgY bị mất đi trong quá trình loại bỏ lipid bằng PEG 3,5% (Polson, 1990). Do đó, dung môi hữu cơ như là chloroform được dùng để thay thế cho PEG trong việc loại bỏ lipid khỏi lòng đỏ trứng. Trong nghiên cứu này, phần protein thu được trong lần kết tủa đầu tiên của phương pháp chloroform cũng cho thấy sự ít tạp nhiễm sắc tố vàng (lutein và zeaxanthin) hơn khi so sánh với phương pháp PEG (hình 1).



Hình 1. Kết tủa protein thu được sau khi kết tủa lần thứ nhất trong phương pháp PEG (A) và phương pháp chloroform (B)

3.2. Nồng độ IgY thu được sau khi gây miễn dịch

Nồng độ IgY chiết xuất được bằng phương pháp chloroform dao động từ 536 - 7805 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n=62$) và phương pháp PEG dao động từ 412 - 5874 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n=58$). Một tuần trước thời điểm gây miễn dịch cho gà, nồng độ IgY thu được từ cả hai phương pháp đạt 592 - 883 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ và không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa hai phương pháp, cũng như giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng ($P > 0,05$). Hai tuần sau lần gây miễn dịch đầu tiên, nồng độ IgY trong lòng đỏ của nhóm gà gây miễn dịch tăng lên $3903 \pm 726 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n = 5$, phương pháp chloroform) và $2937 \pm 294 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n = 5$, phương pháp PEG). Hình 2 cho thấy, kể từ giai đoạn này cho đến kết

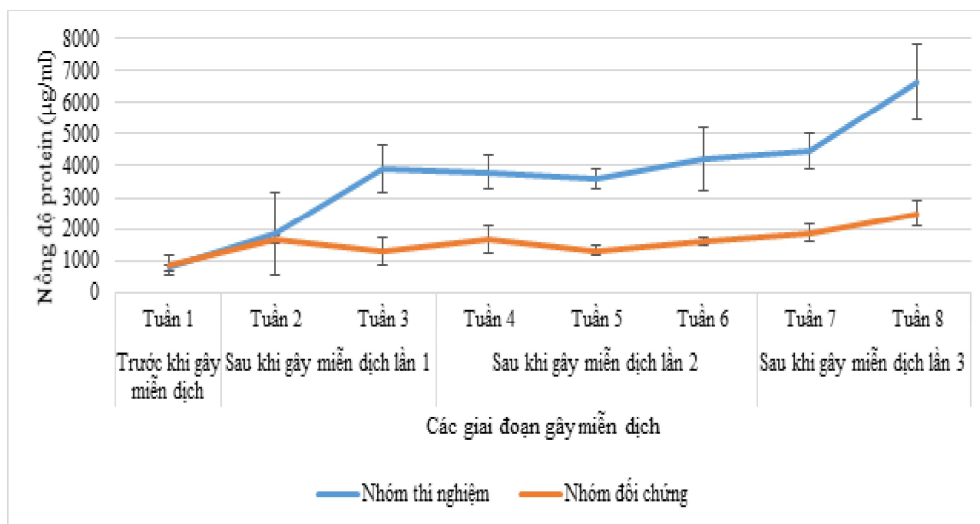
thúc thí nghiệm, nồng độ IgY trong nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng có sự tăng lên có ý nghĩa khi chiết xuất bằng phương pháp chloroform ($P < 0,01$). Sau lần gây miễn dịch thứ ba, nồng độ IgY thu được sau chiết xuất bằng phương pháp chloroform trong nhóm thí nghiệm vẫn tiếp tục gia tăng đến $6633 \pm 1166 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n=3$), và gấp 2,7 lần kết quả của nhóm đối chứng ($2482 \pm 414 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $n=3$). Điều này cho thấy quá trình gây miễn dịch với kháng nguyên kết hợp với chất bổ trợ cho thấy có sự gia tăng về nồng độ của kháng thể IgY trong lòng đỏ trứng so với nhóm không được tiêm kháng nguyên.

Trong khi đó, nồng độ IgY thu được từ phương pháp PEG không cho thấy sự tăng

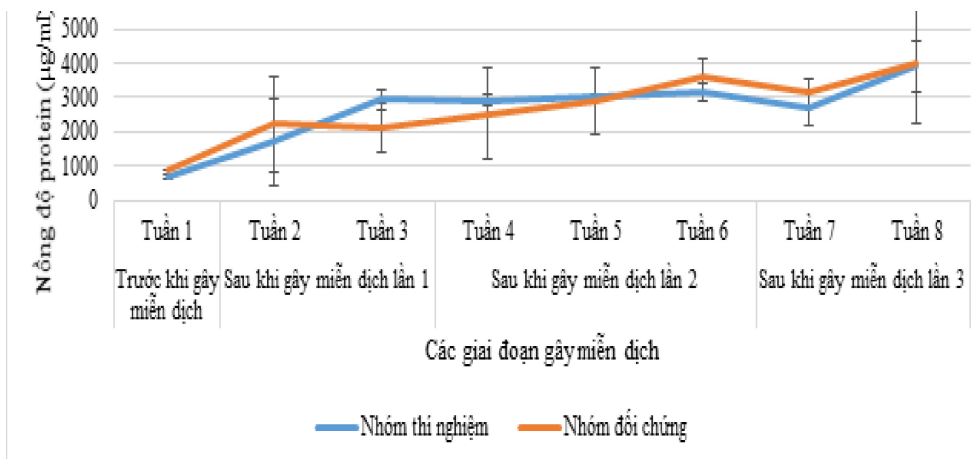
lên có ý nghĩa ($P > 0,05$) ở nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng trong suốt quá trình nghiên cứu (hình 3). Điều này cho thấy việc sử dụng phương pháp chloroform giúp thu nhận nhiều kháng thể trong mẫu sau ly trích hơn, tuy nhiên cần lưu ý là ngoài lựa chọn chất chiết xuất thì tốc độ ly tâm đóng vai trò quan trọng. Polson và cs. (1990) đề nghị sử dụng lực ly tâm $14.000 \times g$, còn Pauly và cs. (2011) đề nghị sử dụng lực ly tâm $13.000 \times g$. Chính vì vậy cần có thêm những nghiên cứu

về chiết xuất ở các tốc độ ly tâm khác nhau.

Tuy nhiên, trong khuôn khổ nghiên cứu này ở cùng điều kiện ly tâm, phương pháp chloroform cho thấy hiệu quả chiết xuất tốt hơn dựa trên hàm lượng IgY thu được cao hơn, do đó quy trình sử dụng phù hợp đối với phương pháp này. Trong khi đó, phương pháp PEG cần phải cải tiến thêm về quy trình (tăng thời gian ly tâm, thay đổi tốc độ ly tâm,...) để đạt được hiệu quả chiết xuất tốt hơn.

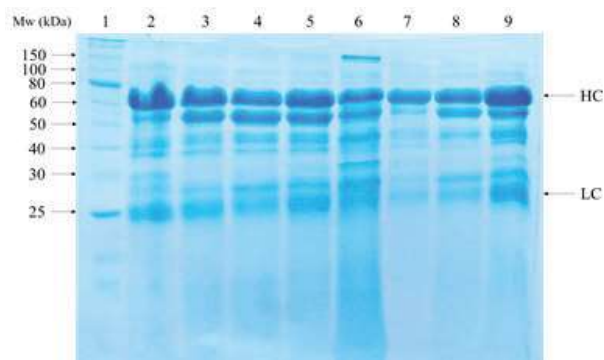


Hình 2. Nồng độ IgY trung bình mỗi tuần ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) được chiết xuất bằng phương pháp chloroform



Hình 3. Nồng độ IgY trung bình mỗi tuần ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) được chiết xuất bằng phương pháp PEG

3.3. Kiểm tra sự hiện diện IgY bằng phương pháp SDS-PAGE



Hình 4. Kết quả SDS-PAGE cho từng mẫu chiết xuất IgY

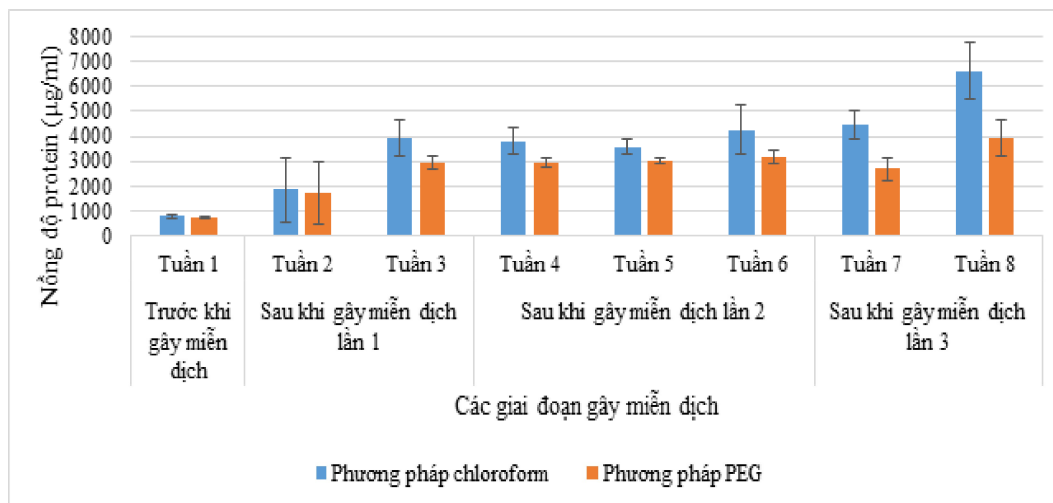
Giếng 1: Thang đo khối lượng phân tử (P7703S, BioLabs Inc., USA); giếng 2 – 7: các mẫu chiết xuất IgY bằng phương pháp PEG; giếng 8 – 9: các mẫu chiết xuất IgY bằng phương pháp chloroform; HC: chuỗi nặng, LC: chuỗi nhẹ.

Các mẫu chiết xuất bằng cả hai phương pháp chloroform và PEG được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE (chloroform: $n = 18$; PEG: $n = 14$) và đều cho thấy sự hiện diện của chuỗi nặng (67 - 70 kDa) và chuỗi nhẹ (25 kDa) cấu thành nên kháng thể IgY (hình 4). Sự xuất hiện của 5 vạch tạp (khác biệt so với vạch của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ) trong tất cả các mẫu chiết xuất bằng cả hai phương pháp chỉ ra rằng độ tinh sạch của các mẫu chiết xuất là không cao. Mặc

dù vậy, kết quả này tốt hơn so với kết quả mà Ali (2013) thu được: 7 vạch tạp xuất hiện trong các mẫu chiết xuất bằng phương pháp chloroform và 5 vạch tạp xuất hiện trong các mẫu chiết xuất bằng phương pháp PEG. Tuy nhiên, độ tinh sạch của các mẫu chiết xuất do Pauly và cs. (2011) thực hiện tương đối thấp, chỉ có 1 vạch tạp xuất hiện trong các mẫu chiết xuất từ nghiên cứu này. Điều này có thể xuất phát từ việc lực ly tâm sử dụng cao hơn ($13000 \times g$) trong quá trình chiết xuất và thẩm tách.

3.4. Nồng độ IgY theo phương pháp chiết xuất

Hai tuần sau lần miễn dịch đầu tiên, nồng độ IgY chiết xuất bằng phương pháp chloroform ở nhóm thí nghiệm đạt trung bình $3903 \pm 726 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ($n = 5$) và cao hơn có ý nghĩa so với phương pháp PEG ($2937 \pm 294 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $n = 5$) ($P < 0,05$). Sự tương quan về kết quả này giữa hai phương pháp được duy trì đến kết thúc thí nghiệm, $6633 \pm 1166 \mu\text{g.ml}^{-1}$ và $3913 \pm 746 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (tương ứng với phương pháp chloroform và PEG ở tuần thứ 8). Nồng độ IgY thu được cao hơn từ phương pháp chloroform so với phương pháp PEG giống với kết quả mà Ali (2013) đã thu được. Do đó, từ kết quả của thí nghiệm này và kết quả của Ali (2013), có thể kết luận phương pháp chloroform cho hiệu quả cao hơn trong việc chiết xuất IgY từ lòng đỏ trứng so với phương pháp PEG.



Hình 5. Nồng độ IgY trung bình mỗi tuần ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) được chiết xuất từ trứng của nhóm gà thí nghiệm bằng phương pháp chloroform và PEG

Theo Yamamoto và cs. (1975), việc gây miễn dịch cho gà cho thấy sự trì hoãn từ 5 - 7 ngày trong sự tăng lên về nồng độ kháng thể. Tuy nhiên, độ nhạy của việc đo đạt hàm lượng protein bằng chất chỉ thị và máy microplate reader là không cao nên không thể phân biệt sự thay đổi về nồng độ protein theo ngày. Do đó, trong nghiên cứu này, sự khác biệt có ý nghĩa của nồng độ IgY trong các mẫu chiết xuất bằng phương pháp chloroform giữa nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng được quan sát thấy từ tuần thứ hai sau lần gây miễn dịch đầu tiên.

IV. KẾT LUẬN

Kháng thể IgY đã được chiết xuất thành công từ lòng đỏ trứng gà bằng cả hai phương pháp PEG và chloroform trong nghiên cứu này. Kết quả chiết xuất bằng phương pháp chloroform cũng cho thấy việc gây miễn dịch cho gà có hiệu quả làm tăng hàm lượng IgY trong trứng của những gà ở nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Kết quả kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE của các mẫu IgY đã được chiết xuất cho thấy sự tinh sạch là không cao và có sự tương đồng giữa hai phương pháp chiết xuất. Do đó, phương pháp chloroform thích hợp hơn cho việc chiết xuất IgY từ lòng đỏ trứng.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn Quỹ nghiên cứu khoa học của trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM đã cấp kinh phí thực hiện nghiên cứu. Các tác giả cũng đánh giá cao sự phối hợp và giúp đỡ của Trại nghiên cứu ứng dụng (Đại học Nông Lâm Tp. HCM), Phòng xét nghiệm lý - hóa (Chi cục Thú y vùng 6), Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học (Bộ môn Công nghệ sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. HCM) trong việc thực hiện các thí nghiệm và phân tích mẫu của đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. A. Polson, M.B. von Wechmar, G. Fazakerley, 1980. Antibodies to proteins from yolk of immunized hens. *Immunol. Commun.* 9(5):

pp. 495–514.

2. A. Polson, 1990. Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform Polyethylene glycol procedure. *Immunol. Commun.* 19(3): 253-258.
3. Ali A. Al-Edany, 2013. Preparation and purification of Immunoglobulin y from egg yolk of immunized hens. *Journal of Thi-Qar University* no.2, vol. 8, pp.7-16.
4. C. Vega, M. Bok, L. Saif, F. Fernandez, V. Parreño, 2015. Egg yolk IgY antibodies: a therapeutic intervention against group A rotavirus in calves. *Res. Vet. Sci.* 103: pp. 1–10.
5. D. Pauly, P.A. Chacana, E.G. Calzado, B. Brembs, R. Schade, 2011. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol(PEG) precipitation. *J. Vis. Exp.* 1(51): pp. 1–6.
6. H. Lee, Y. Jeon, C. Park, S. Kim, D.S. Lee, C. Lee, 2015. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk antibody (IgY) against a recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in piglets. *Arch. Virol.* 160(9): pp. 2197–2207.
7. K. Horie, N. Horie, A.M. Abdou, J. Yang, S. Yun, H. Chun, et al., 2004. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans, *J. Dairy Sci.* 87(12), pp. 4073–4079.
8. K. Nasiri, M.R. Nassiri, M. Tahmoorespur, A. Haghparast, S. Zibae, 2016. Production and characterization of egg yolk antibody (IgY) against recombinant. VP8-S2 antigen, *Pol. J. Vet. Sci.* 19(2): pp. 271–279.
9. Klemperer, 1983. Ueber natürliche immunität und ihre verwerthung für die immunisierungstherapie, *Archiv. Experiment. Pathol. Pharmacol.* 31: pp. 356–382.

10. M. Pizarro-Guajardo, F. Díaz-González, M. Álvarez-Lobos, D. Paredes-Sabja, 2017. Characterization of chicken IgY specific to *Clostridium difficile* R20291 spores and the effect of oral administration in mouse models of initiation and recurrent disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: pp. 1–16.
 11. M. Walczak, R. Grzywa, A. Lupicka-Slowik, M. Skorenski, K. Bobrek, D. Nowak, *et al.*, 2015. Method for generation of peptide-specific IgY antibodies directed to *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen binding protein epitope. *Biopolymers* 104(5): pp. 552–559.
 12. R. Cakir-Koc, 2016. Production of anti-SAG-1 IgY antibody against *Toxoplasma gondii* parasites and evaluation of antibody activity by ELISA method. *Parasitol. Res.* 115(8): pp. 2947–2952.
 13. S. Rahman, S.V. Nguyen, F.C. Icatlo Jr., K. Umeda, Y. Kodama, 2013. Oral passive IgY based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases, *Hum. Vaccin. Immunother.* 9(5): pp. 1039–1048.
 14. Schade R. *et al.*, 2001. Chicken egg yolk antibodies, production and application igy-technology, *Springer Lab manual*.
 15. Schade R., Staak C., Hendriksen C., Erhard M., Hugl H., Koch G., *et al.*, 1996. The production of Avian (egg yolk) antibodies: IgY. *The report and recommendations of ECVAM workshop* 21, ATLA 24, pp. 925–934.
 16. Sunwoo, H. H., Nakano, T., Dixon, W. T. and Sim, J. S., 1996. Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Sci.* 75: pp. 342–345.
 17. Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T., 2004. Effect of dietary anti-*Helicobacter pylori*-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 20: pp. 185–192.
 18. X. Li, Y. Yao, X. Wang, Y. Zhen, P.A. Thacker, L. Wang, *et al.*, 2016. Chicken egg yolk antibodies (IgY) modulate the intestinal mucosal immune response in a mouse model of *Salmonella typhimurium* infection, *Int. Immunopharmacol.* 36: pp. 305–314.
 19. X. Zhang, T. Diraviyam, X. Li, G. Yao, A. Michael, 2016. Preparation of chicken IgY against recombinant E2 protein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) and development of ELISA and ICA for BVDV detection, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(12): pp. 2467–2472.
 20. Yamamoto H, Watanabe H, Sato G, 1975. Identification of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity. *Jap J Vet Res* 23: pp. 131–40.
- Ngày nhận 16-12-2019
 Ngày phản biện 12-4-2020
 Ngày đăng 1-11-2020