

ARTÍCULO ORIGINAL

Obtención y purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis*

Paola Barroso, Hansen Murcia, Nohora Vega, Gerardo Pérez

Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

Introducción. Las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallina (IgY) han sido ampliamente utilizadas en inmunología, bioquímica, biotecnología y salud humana y animal. Aunque presentan una serie de ventajas frente a las IgG de mamíferos, su aislamiento requiere, por una parte, la eliminación de los lípidos presentes en la yema del huevo sin alterar su funcionalidad y, por otra, la utilización de metodologías de purificación que permitan una recuperación tal que haga factible su empleo como herramientas de detección y purificación a una escala significativa.

Objetivo. Dado el interés que presenta el antígeno Tn como marcador tumoral en muchos tipos de cáncer, y la capacidad que tiene la lectina aislada de semillas de *Salvia bogotensis* para reconocer específicamente este antígeno, se adelantó el presente trabajo con la meta de disponer de IgY anti-lectina para emplearla en estudios inmunohistoquímicos y de biología celular.

Materiales y métodos. Se produjo IgY anti-lectina inmunizando gallinas con lectina de *S. bogotensis* y se evaluó la respuesta inmune en función de la dosis y del tiempo; se ensayaron varios métodos de remoción de lípidos y de extracción y se compararon los rendimientos y la pureza de IgY obtenidas con varios métodos de purificación.

Resultados. El mejor método de delipidación y extracción de IgY requiere dilución con agua, acidificación del extracto y precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%, recuperándose 43,35 mg de proteína/yema. La cromatografía tiofílica permite obtener las IgY puras en buena cantidad (10,4 mg/yema), preservando la funcionalidad y características de estos anticuerpos.

Conclusión. Se establecieron las mejores condiciones para extraer y purificar IgY funcionales dirigidas contra la lectina de *S. bogotensis*.

Palabras clave: Lamiaceae, inmunoglobulinas Y, *Salvia*, lectina, purificación, antígeno Tn.

Purification of IgY against *Salvia bogotensis* lectin

Introduction. Egg yolk immunoglobulins (IgY) have been extensively used in immunology, biochemistry, and biotechnology in studies of human and animal health. However, their use requires two preparatory steps: first, the egg yolk lipids must be removed without impairing the immunoglobulin functional properties, and second, the isolation methods must allow high recoveries for further use as detection and purification tools.

Objective. Because Tn antigen presence serves as a tumoral marker and because *S. bogotensis* lectin's can specifically recognize this antigen, the current study aims at making available an anti-lectin IgY. This tool will be useful in histochemical and cellular studies involving transformed cells.

Materials and methods. Anti-lectin IgY was produced by immunization of hens with *S. bogotensis* lectin, and the effect of antigen dose on IgY levels was assessed. Several methods for lipid removal, IgY extraction and purification were assayed, and yields and purity of IgYs were established for each method.

Results. The best delipidation and extraction method included yolk dilution with water under acidic conditions and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% precipitation from which 43 mg protein/yolk were recovered. Among the chromatographic methods, thiophilic chromatography permitted the

recovery of a substantial quantity of pure IgY (10.4 mg IgY/yolk). With this method, the function and characteristics of IgY were preserved.

Conclusion. The best conditions for anti-*S. bogotensis* functional IgY extraction and purification were established.

Key words: Lamiaceae, immunoglobulin Y, *Salvia bogotensis*, lectin, purification, Tn antigen.

Las inmunoglobulinas presentes en la yema de huevo de gallinas (IgY) son una alternativa muy interesante como herramientas en multitud de estudios de inmunología, bioquímica, biotecnología, salud humana y animal. Ejemplos recientes de su variada utilización son la producción de fragmentos Fab' para evitar reacciones alérgicas a proteínas de huevo (1), para producción de anticuerpos contra antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (2), así como contra la timidín cinasa humana (3), un trisacárido de galactosa que actúa como antígeno presente en células endoteliales de cerdo (4), y contra el virus de Sendai (5) o algunos venenos de serpiente (6).

Las propiedades fisicoquímicas y la relación evolutiva de estos anticuerpos con las IgG han sido objeto de varias revisiones recientes (7-9); algunas características fisicoquímicas son diferentes a las de IgG, ya que bajo condiciones reductoras no requieren de agentes desnaturizantes para disociarse en dos cadenas: una liviana (L) con un PM de 20 a 25 kd y una pesada (H) con PM de 65 a 70 kd y, además, se agregan en condiciones de fuerza iónica alta (1,5 M NaCl) y su pl es menor en una unidad de pH que el de IgG.

Este tipo de inmunoglobulina es el único presente en cantidades significativas en la yema del huevo; estas proteínas son transportadas desde el suero durante la maduración de la yema en el oviducto por un mecanismo similar a la transferencia placentaria que ocurre en mamíferos (10). Ello resulta en mayores concentraciones de IgY en la yema que en el suero; diferentes determinaciones

arrojan valores hasta de 15 a 25 mg de inmunoglobulinas por ml de yema en gallinas hiperinmunizadas (11) y, dependiendo del método de aislamiento, se pueden recuperar entre 3 y 5 mg de anticuerpo/ml de yema (12), por lo que el método empleado en su purificación es crítico para lograr buenos rendimientos.

Estas proteínas presentan una serie de ventajas frente a las IgG de mamíferos debido a diferencias de comportamiento en varios aspectos de la respuesta inmune, como son las siguientes: a diferencia de las IgG de mamífero, funcionalmente las IgY no interactúan con factores reumatoideos (13), de tal manera que la probabilidad de dar falsos positivos en ensayos inmunoquímicos disminuye; al contrario de lo que ocurre con la IgG de mamíferos, las IgY no se unen a la proteína A estafilocócica (14), ni a la proteína G, ni al sistema de complemento humano (15). Estas diferencias, sumadas a la distancia evolutiva existente que resulta en una mayor inmunogenicidad de proteínas de mamíferos inyectadas en aves (2,11) y a las enormes cantidades de IgY producidas por la gallina en su período de postura (150-225 mg/yema), han despertado mucho interés por su utilización. Sin embargo, sus aplicaciones se han visto restringidas por la presencia de los lípidos, que constituyen 50% de la yema, la cual posee un alto contenido de colesterol y fosfolípidos dispersados en vitelinas y otras fosfolipoproteínas de baja densidad. La necesidad de eliminar estos lípidos para recuperar eficientemente las IgY ya se reconoció en trabajos pioneros (16). Por otra parte, su purificación se ha ensayado con una variedad de técnicas bioquímicas, con resultados poco alentadores en algunos casos, debido probablemente al bajo contenido (1%) de IgY policlonales específicos contra un antígeno dado. El interés de desarrollar métodos de purificación eficientes de IgY se ve reforzado porque la preparación de Ab monoclonales de gallina contra algunos antígenos es difícil y parece poco práctica (7).

Correspondencia:

Gerardo Pérez, Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Teléfono: 57-1-3165000 ext 14465/14470

Fax: 57-1-3165220

jrperezg@unal.edu.co

Recibido: 18/05/05; aceptado: 26/05/05

Entre los distintos tipos de carbohidratos reconocidos por gran diversidad de lectinas presentes tanto en plantas como en animales, se encuentran los antígenos T y Tn localizados en glicoproteínas de la membrana celular. La exposición del antígeno Tn en eritrocitos ocasiona el síndrome Tn, o síndrome de poliaglutinabilidad, que es un trastorno caracterizado por la presencia de residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la superficie de la célula roja que, normalmente, se encuentran enmascarados y unidos a Ser/Thr en las sialoglicoproteínas de membrana (17,18). Los antígenos T y Tn también se han encontrado asociados a carcinomas, expuestos en la membrana externa de células tumorales comunes y en metástasis (19,20); la proporción relativa de estos antígenos en las células está estrechamente relacionada con la agresividad con la que evoluciona el tejido canceroso (20).

Considerando lo anterior, y dado el interés de nuestro Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP), en desarrollar herramientas que combinadas con las lectinas permitan la detección del antígeno Tn en células tumorales, se ensayó la producción de IgY contra la lectina de *Salvia bogotensis* (LSB); se evaluaron los procedimientos de remoción de lípidos de la yema de huevos de gallinas inmunizadas, y se ensayaron los procedimientos de purificación para obtener buenos rendimientos de IgY funcionales, capaces de reconocer el antígeno Tn. Los resultados obtenidos se describen en el presente trabajo.

Materiales y métodos

Inmunización

Los procedimientos en animales se ajustaron al protocolo para uso de animales del INS y el proyecto de investigación del cual hace parte este trabajo fue avalado por el Comité de Ética de la División de Investigaciones de la Universidad Nacional.

Con la lectina de *S. bogotensis* purificada según Vega (21) se prepararon soluciones de 100 µg/ml, 400 µg/ml y 1000 µg/ml en PBS (fosfatos 20 mM, NaCl 150 mM) pH 7,2. A 1 ml de adyuvante de Freund se agregó gota a gota 1 ml de estas

soluciones con agitación vigorosa para obtener buena emulsificación; para el primer reto se usó adyuvante completo y para los refuerzos, adyuvante incompleto. Un ml de la emulsión se aplicó en dos sitios del músculo pectoral de gallinas de raza High-Line en edad de plena postura (20 semanas) mantenidas en jaulas individuales con agua y alimento *ad libitum*. Se organizaron cuatro grupos de tres animales cada uno, de los cuales el primero correspondió al grupo control.

El esquema de inmunización fue similar al descrito por Gassman *et al.* (2), empleando dosis de 50 y 200 µg de LSB por inoculación a los días 0, 10, 20 y 29 y dosis de 500 µg de LSB por inoculación a los días 0 y 20 para un total de 200, 800 y 1000 µg LSB/gallina, respectivamente. Los huevos se recogieron desde el día 9 hasta el día 90; cada huevo se marcó con el número de la gallina correspondiente y la fecha de recolección. Los huevos se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. Se llevó un registro de postura minucioso para cada gallina.

Remoción de lípidos y extracción de IgY

Sin romper el vitelio, las yemas fueron separadas cuidadosamente de las claras y se lavaron con un pequeño volumen de H₂O destilada, se secaron sobre papel de filtro y se midieron los volúmenes de cada una.

Se compararon distintos métodos de delipidación y extracción de IgY con ensayos preliminares en pequeña escala (1 a 2 yemas), para establecer los rendimientos de proteína luego de la deslipidación y de la precipitación. Se ensayaron los métodos de Polson *et al.* (12) y Jensenius y Koch (22), que utilizan dilución con *buffer* y precipitación con PEG 8000 al 3,5% o 4,4%, respectivamente; el método de Jensenius *et al.* (16) precipitando con sulfato de dextrano y CaCl₂; el método de Akita y Nakai (23) diluyendo con agua sin acidificar y dos precipitaciones al 19% y 14% con Na₂SO₄, y el método de Akita y Nakai (24) diluyendo con agua acidificada a pH 5,0 y precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 60% s. Para determinar la heterogeneidad de los extractos se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) comparando alícuotas tomadas después de la delipidación de las yemas y de la

muestra final después de cada precipitación. La actividad de las fracciones después del paso de deslipidación y del paso de precipitación se determinó por ensayos de ELISA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se utilizó uno de los siguientes métodos para la extracción de las IgY a mayor escala. Se escogieron yemas de huevos de fechas cercanas a los títulos más altos (dosis de 200 µg en la inmunización). Para cada experimento se utilizaron 8 yemas (13 ml/yema). Se llevaron a un volumen final de 1.040 ml con 936 ml de agua destilada (dilución 1:10) y se extrajeron según la metodología que emplea dilución con agua sin acidificación y precipitación con Na₂SO₄ (23), o dilución con agua con acidificación y precipitación con (NH₄)₂SO₄ (24); los volúmenes del extracto final fueron de 43 ml (1,28 mg proteína/ml) y de 40 ml (0,9 mg proteína/ml), respectivamente. El título en cada paso se determinó por ELISA. Se tomó como título la máxima dilución a la cual aún se apreciaba actividad. Como valor mínimo de actividad se tomó tres veces el valor de absorbancia del blanco (0,097 AU).

Determinación de proteína

La cantidad de proteína en los extractos se cuantificó por el método de Bradford (25) utilizando un micrométodo desarrollado en el laboratorio. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, en los que se hizo una curva de calibración por duplicado (2,5, 10, 15 y 20 µl de solución) con BSA (0,5 a 0,7 mg/ml). Tanto las muestras como el patrón de BSA se llevaron a un volumen de 20 µl con PBS pH 7,3 y se agregaron 200 µl del reactivo de Bradford. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 595 nm en un lector de microplaca BioRad Model 550. A partir de la curva de calibración se determinó la cantidad de proteína por interpolación.

Las muestras de IgY purificadas se cuantificaron por el método del ácido bicinonínico (BCA) (26) empleando una curva de calibración similar a la descrita. A cada pozo se agregaron 100 µl de *buffer* carbonato pH 11,4 (Na₂CO₃ 0,25 M, NaHCO₃ 0,1 M) y 100 µl de reactivo preparado así: a una solución de BCA al 1% en agua destilada se adicionaron 4 µl de solución de Na₂SO₄ al 2% en

agua por cada 100 µl de solución de BCA. A cada pozo se agregó la solución a cuantificar (20 µl). Se dejó incubar durante media hora a 37 °C y se leyó a 540 nm.

Ensayos de ELISA

La presencia de IgY específicas para LSB en las yemas durante el curso de la inmunización se estableció sensibilizando las placas con las inmunoglobulinas deslipidadas y parcialmente fraccionadas según Polson *et al.*(12); las determinaciones se hicieron sobre soluciones cuya concentración de proteína fuera similar para evitar errores debidos a diferencias de recuperación de las fracciones. La incubación en tampón de carbonatos 0,1 M pH 9,6 se hizo durante 3 horas a 37°C y durante la noche a 4°C, se bloqueó con PBS-BSA (1,3%) durante 1 hora a 37°C, se sembraron 100 µl de LSB (77 µg/ml) incubando durante 1 hora a 37°C y, luego, 100 µl de IgG-anti-LSB (generado en conejo) (21) durante 1 hora a 37°C. Se reveló con 100 µl de anti-IgG (generado en cabra, Sigma) marcado con peroxidasa e incubando con ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline)-6-sulfónico (ABTS). Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de microplaca BioRad Model 550. Entre cada paso se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,1%.

Se evaluó la actividad de cada una de las fracciones obtenidas en los ensayos de remoción de lípidos y de los pasos de extracción por dilución con agua a pH 5,0 y pH 6,2; las placas se sensibilizaron con LSB (30 µg/ml) y se siguió la metodología descrita por Vega (21) usando como segundo anticuerpo un anti-IgY (generado en cabra, Sigma) y acoplado a peroxidasa, en una dilución de 1/1000 en PBS-suero fetal bovino (SFB) (10%).

En los ensayos preliminares se emplearon las fracciones deslipidada y final a una concentración de 500 µg/ml en SFB 10%. El título de los diferentes pasos de extracción de IgY se evaluó haciendo diluciones seriadas a partir de una solución de 500 µg/ml para un volumen final de 100 µl por pozo en cada dilución.

Para determinar el título durante la purificación se siguió la metodología ya descrita sensibilizando

con la lectina (15 ug/ml) disuelta en tampón de Na_2CO_3 1 M, pH 9,6. Con las fracciones obtenidas en las etapas de purificación del anticuerpo se prepararon soluciones de 0,5 mg/ml y se realizaron diluciones seriadas a un volumen final de 100 μl /pozo. La detección de la interacción se hizo con un Ab secundario acoplado a peroxidasa (anti-IgY gallina, generado en cabra, Sigma).

Purificación IgY

Con los extractos finales se ensayó la purificación por diversas cromatografías de columna basadas en diferentes principios de separación.

DEAE-Sephacel

Se utilizó el método descrito por Baines y Thorpe (27). Del extracto sin acidificar se sembraron 9 ml (8,2 mg) equilibrados en tampón de fosfatos 70 mM pH 6,3 sobre una columna de DEAE-Sephacel (1,8 x 6,5 cm). La fracción no retenida se eluyó con tampón de equilibrio y el retenido se eluyó con tampón de fosfatos pH 6,3-NaCl 1 M. Las fracciones retenida y no retenida se dializaron contra NH_4HCO_3 20 mM y se congelaron.

Esta cromatografía se hizo también bajo las siguientes condiciones. Se sembraron 18 ml (23 mg) de extracto final obtenido por dilución con agua a pH 5,0 y equilibrado en tampón de fosfatos pH 6,3. La fracción no retenida se eluyó con el tampón de equilibrio. Luego se eluyó el retenido a diferentes pH. La primera elución se hizo con tampón de glicina 50 mM-HCl pH 2,8 neutralizando cada fracción colectada (1 ml) con 200 μl de tampón Tris 200 mM-HCl pH 8,8, la segunda fracción se eluyó con tampón de fosfatos 50 mM pH 7,3, la tercera fracción con tampón de Tris 50 mM -HCl pH 8,8 y la última fracción con tampón de fosfatos pH 6,3-NaCl 1 M. Estas fracciones se dializaron contra NH_4HCO_3 20 mM y se concentraron por liofilización.

Fenil-sefarosa-4B

Se empleó el procedimiento descrito por Hassl y Aspöck (28). Se tomaron 4 ml (3,6 mg) del extracto sin acidificar equilibrado en NaCl 1% y se sembraron sobre una columna de fenil-sefarosa 4B (1 x 50 cm). La fracción no retenida se eluyó con NaCl 1% y la fracción retenida con agua

desionizada. Luego, se lavó la columna con 50 ml de acetonitrilo (MeCN) al 70% (v/v) para eliminar cualquier sustancia que hubiese permanecido retenida en la columna.

Sephacryl S-200

Se utilizó una columna de Sephacryl S-200 (1x80 cm) sobre la cual se sembraron 3 ml (2,7 mg) de extracto sin acidificar. La columna se eluyó con NaCl 1%. En otras cromatografías se sembró 1 ml de la fracción eluida con glicina-HCl, pH 2,8, proveniente de DEAE-Sephacel (2,1 mg) o 1 ml de extracto de IgY precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%_s (24,5 mg). Se corrió con tampón de fosfatos 20 mM pH 7,3-NaCl 1 M. A cada fracción sembrada se agregaron 87 mg de NaCl.

Sephacryl S-500

Se utilizó una columna de Sephacryl S-500 (1x92 cm) donde se sembró 1 ml (0,9 mg) de extracto sin acidificar. La elución se realizó con NaCl 1%.

Cromatografía tiofílica

Se siguió la técnica de Hansen *et al.* (29). Se utilizó un soporte de Sefarosa 4B activado con divinilsulfona (DVS) al cual se acopló β -mercaptoetanol (β -MESH) modificando parcialmente el método de Hermanson *et al.* (30). Se colocaron 2 ml de sefarosa 4B lavados con 20 ml de agua destilada sobre un embudo con placa sinterizada y se eliminó el exceso de agua; el gel se resuspendió en 2 ml de Na_2CO_3 0,5 M, pH 11,0, y se dejó en agitación suave. Se agregaron después 200 μl de DVS, gota a gota en constante agitación durante un lapso de 15 minutos y se dejó ocho horas. Se lavó con abundante agua destilada hasta que el pH del lavado fuese neutro. En este paso el gel se puede emplear para acoplar cualquier ligando de interés o puede ser almacenado para su uso posterior. Para el acople del ligando, en este caso β -MESH, se tomó el gel activado y se lavó en un embudo con 20 ml de Na_2CO_3 0,5 M pH 11,0, se eliminó la solución de carbonato en un embudo y se resuspendió en 2 ml de Na_2CO_3 0,5 M. Se adicionaron 400 μl de β -MESH al 99% y se dejó en agitación permanente durante 18 horas. Se eliminó la solución y se lavó el gel con abundante agua y con NaCl 1 M. Posteriormente, el soporte (T-gel) se equilibró

en tampón de fosfatos 50 mM pH 7,3- Na_2SO_4 0,5 M. Se sembraron 3 ml (2,7 mg) de extracto sin acidificar, al cual se agregaron 71 mg de Na_2SO_4 por mililitro de extracto. La elución del no retenido se realizó con el tampón de equilibrio y el retenido se eluyó con tampón de fosfatos 50 mM pH 7,3. Se realizaron ensayos análogos con extractos acidificados.

Las fracciones provenientes de las diferentes cromatografías se recolectaron y algunas se concentraron en Microsep Omega de 10 kd a 7000 rpm (5.857g). Las fracciones de anticuerpo puro se cuantificaron por BCA.

Electroforesis en poliacrilamida (PAGE-SDS)

La preparación de los geles de poliacrilamida se realizó según Laemmli (31). En cada pozo se sembraron 20 μg de proteína más 5 μl de tampón muestra con reductor (β -MESH). Para las electroforesis en condiciones no reductoras se omitió el β -mercaptoetanol. Se utilizaron geles al 12% y 8% (C 2,5%). Como tampón de corrido se utilizó Tris 25 mM-glicina 192 mM, pH 8,8. La electroforesis se corrió a 150 V durante hora y media. Luego del corrido, los geles se fijaron y colorearon con solución de Coomassie R 250 durante tres horas.

Dot-blot

Con los extractos y las fracciones retenidas en la cromatografía tiofílica se realizó un *dot blot* directo para detectar la presencia de IgY y la interacción de las mismas con la LSB. La metodología para la detección fue la siguiente: en una microplaca (10 μl) se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los anticuerpos en PBS-SFB (10%) y se sembraron 5 μl por punto sobre la membrana de nitrocelulosa; se dejó una hora a temperatura ambiente. Se bloqueó agregando 20 ml de PBS-SFB (10%) y dejando en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Luego, se adicionó una dilución 1/1000 de IgG anti-IgY (cabra) acoplado a peroxidasa. Se reveló con una solución de 50 mg de diaminobenzamidina (DAB) en 100 ml de PBS y 10 μl de H_2O_2 al 30%; la reacción se detuvo con agua desionizada. Entre cada paso se hicieron tres lavados agregando 20 ml de PBS-Tween (0,1%), a excepción del último,

en el cual se lavó cinco veces. Entre el segundo y el tercer paso no se realizó el lavado.

El *dot-blot* para determinar la funcionalidad de las IgY se realizó así: sobre membranas de nitrocelulosa se colocaron 5 μl de lectina pura (0,608 mg/ml) en PBS por punto durante una hora a temperatura ambiente. Se bloqueó agregando 20 ml de PBS-SFB (10%) durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron las membranas con diluciones de las IgY en PBS-SFB (10%) durante una hora a temperatura ambiente y 12 horas a 4°C. Se incubó con una dilución de 1/1000 de IgG anti-IgY-peroxidasa en PBS-SFB (10%), dejando en agitación durante una hora a temperatura ambiente. Se reveló y lavó siguiendo el procedimiento anterior.

Resultados

Ensayos de inmunización

El control de postura mostró una producción de huevos sin caídas apreciables durante los 90 días de la recolección. La producción de IgY, obtenidas según Polson *et al.* (12) y evaluada por ELISA, se muestra en la figura 1. Con la dosis más baja de LSB (50 μg) se observó un período de máxima producción entre los 26 y los 40 a 45 días, mientras que para 200 y 500 μg de antígeno por

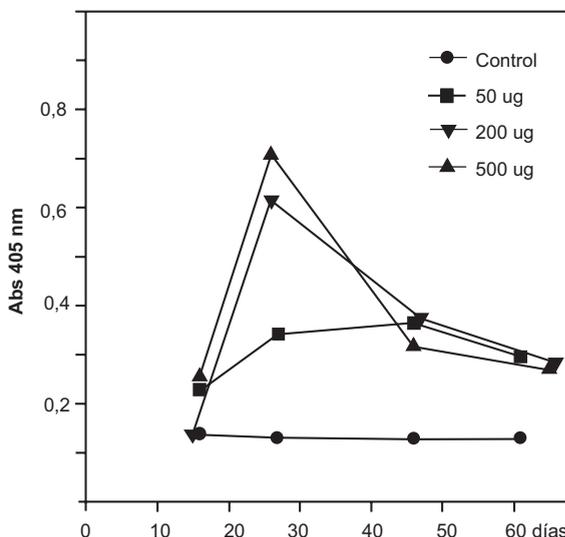


Figura 1. Producción de IgY durante el período de la inmunización con diferentes dosis de lectina de *Salvia bogotensis*.

inoculación, el pico máximo estuvo alrededor de los 26 días y luego comenzó a declinar, permaneciendo a los 60 días en niveles significativamente mayores que los de los controles.

Los datos de ELISA evidenciaron cantidades apreciables de IgY que se correlacionaron con las dosis de antígeno aplicadas. Las determinaciones de título (yemas de 26 a 27 días) mostraron que las diluciones superiores a 1:200 presentaban por ELISA valores constantes y muy cercanos a los controles con yemas de animales no inmunizados. Un comportamiento similar se observó con yemas de 40 y 65 días, corroborándose así que la respuesta inmune se mantenía después de varias semanas del último refuerzo.

Ensayos de deslipidación y extracción

Una vez realizados los diversos ensayos de remoción de lípidos y precipitación (fracción final) se cuantificó la proteína; los resultados se presentan en el cuadro 1. Se observa que la delipidación con PEG 8000 al 3,5% o 4,4% (12,22) permite recuperar cantidades importantes y similares de proteína con pocos contaminantes como se aprecia en el perfil por PAGE-SDS, particularmente en el caso de la precipitación con PEG al 3,5% (figura 2, carril 5).

Cuando se utiliza la deslipidación con sulfato de dextrano y CaCl_2 (16), la cantidad de proteína recuperada en el precipitado final no es muy alta

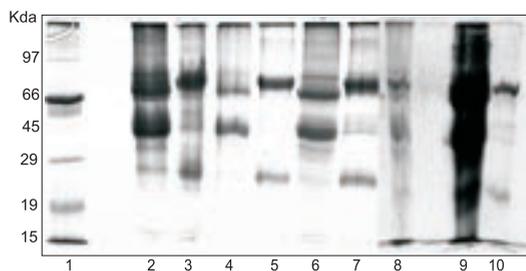


Figura 2. Análisis por PAGE-SDS de las fracciones delipidadas y finales. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: agua deslipidada; 3: agua final; 4: PEG 3,5% deslipidado; 5: PEG 3,5% final; 6: PEG 4,4% deslipidado; 7: PEG 4,4% final; 8: dextrano deslipidado; 9: dextrano deslipidado; 10: dextrano final.

aunque contiene muy pocos contaminantes cuando se evalúa por PAGE-SDS; sin embargo, al agregar Na_2SO_4 para precipitar las proteínas solubles apareció un precipitado blanco difícil de eliminar por diálisis, el cual ocasionó un corrido difuso de las muestras por electroforesis (figura 2, carril 10).

La deslipidación por dilución con agua sin acidificar (23) ocasiona algunos contaminantes en la región de alto peso molecular y en la de 45 a 50 kd que no corresponden a las bandas H (70 kd) ni L (25 kd) (figura 2, carril 3; figura 3A, carril 3), y, además, la remoción de los lípidos de la yema es incompleta. Akita y Nakai (24) mostraron que el método de dilución con agua puede optimizarse disminuyendo el pH de aproximadamente 6,2 a pH 5,0 con HCl 0,1 M; al incubar durante seis horas a pH 5,0 observamos que se removió casi toda la fracción lipídica y se recuperó una gran cantidad de proteína (45 mg/yema); además, la acidificación del extracto permitió eliminar gran cantidad de contaminantes de alto peso molecular (>70 kd) (figura 3B, carril 3); en este extracto fueron claramente visibles las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas de la IgY, aunque estas últimas presentaron una menor intensidad de tinción con Coomassie R250, lo que corrobora observaciones previas (29).

Las dos precipitaciones al 19% y 14% con Na_2SO_4 del método sin acidificar (23) se pueden reemplazar por una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60%, haciendo el proceso más rápido y práctico. En la figura 3B (carril 4) se observa que con esta precipitación se eliminaron los contaminantes de mayor peso y se concentraron algunos entre 36 y 45 kd; además, se sorteó el problema de las temperaturas bajas a las cuales el Na_2SO_4 precipita, mientras que con el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se puede trabajar a 0°C. Por otro lado, la cantidad de contaminantes presentes en el precipitado con Na_2SO_4 al 19% se puede reducir haciendo una segunda precipitación al 14% (figura 3A, carril 4).

Con la excepción de los tratamientos con sulfato de dextrano, los ensayos de actividad por ELISA de las fracciones de IgY deslipidadas y finales (luego de precipitación) mostraron, como era de esperarse, mayor actividad en éstas últimas; los

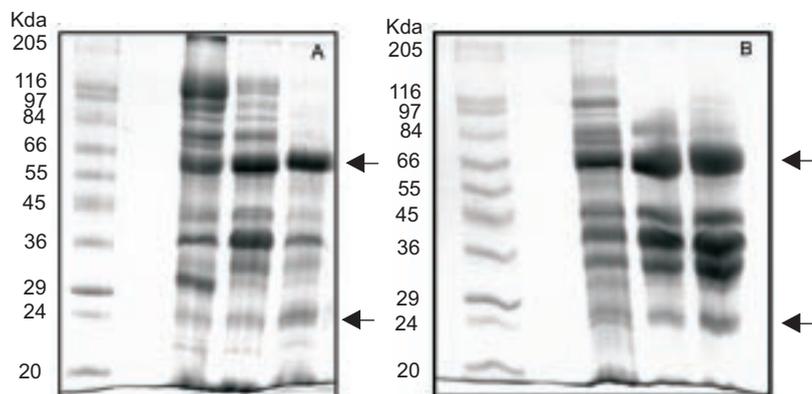


Figura 3. Análisis por PAGE-SDS de (A) fracciones deslipidadas y extraídas con agua a pH 6,2. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: extracto pH 6,2; 3: deslipidado; 4: precipitación con Na_2SO_4 19%. (B) fracciones deslipidadas y extraídas con agua a pH 5,0. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: extracto pH 5,0; 3: deslipidado; 4: precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% s. Las flechas indican la posición de las cadenas H y L.

Cuadro 1. Cuantificación de proteína en las fracciones provenientes de los ensayos de deslipidación.

Fracción	Volumen yema utilizado (ml)	Proteína (mg)	Volumen yema (ml)	Proteína recuperada por yema (mg)
PEG 8000 3,5 % deslipidado	3,25	14,74	13	12,20
PEG 8000 3,5% final		3,05		
PEG 8000 4,4% deslipidado	3,25	11,98	13	14,40
PEG 8000 4,4% final		3,60		
Dextrano deslipidado	3,25	11,89	13	8,32
Dextrano final		2,08		
Agua deslipidada sin acidificar	3,25	27,32	13	7,96
Agua final	13,0	1,99	13	45,35
Agua pH 5,0 deslipidado		128,23		
Agua pH 5,0 final		45,35		

extractos finales con PEG 3,5% y 4,4% mostraron actividades menores (Abs_{405} 0,300-0,450) que los obtenidos con agua sin acidificar (Abs_{405} 0,650), probablemente debido a una desnaturalización parcial de las IgY por la precipitación etanólica.

Como el método de dilución con agua permite la extracción de IgY sin afectar su actividad, se decidió evaluar el anticuerpo en cada etapa de extracción. Los resultados se muestran en la figura 4A para el método sin acidificar y en la figura 4B para el método acidificando a pH 5,0. En los dos procesos se observó que a medida que se progresó en la obtención de las IgY, los valores de título y absorbancia (para una cantidad dada de proteína total) aumentaron, siendo bastante significativos para la fracción reprecipitada con

Na_2SO_4 al 14% (título 1:64 ;7,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y en la fracción precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% (título 1:8; 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Por otra parte, aunque el extracto acidificado tuvo un menor título, la cantidad de proteína soluble fue mucho mayor, lo cual confirma la excelente recuperación indicada en el cuadro 1.

Ensayos de purificación de IgY

Las fracciones recolectadas en las diferentes cromatografías fueron concentradas por liofilización y se cuantificaron por Bradford o por BCA. Las cantidades de proteína en cada fracción se presentan en el cuadro 2, así como las cantidades de proteína total recuperadas.

Del extracto delipidado sin acidificar se tomaron 8,2 mg de proteína y se aplicaron sobre una

columna de DEAE-Sephacel. En la figura 5A se muestra el perfil cromatográfico obtenido, en el cual se encuentra una fracción no retenida muy pequeña y cuatro picos eluidos a alta fuerza iónica; los ensayos de detección mostraron que sólo en los picos II y III están presentes las IgY (figura 6A, carriles 4 y 5). Para tratar de mejorar esta separación, el extracto acidificado (23 mg de proteína) se eluyó con un gradiente discontinuo de pH aprovechando la experiencia obtenida en el fraccionamiento de IgG de conejo contra la lectina

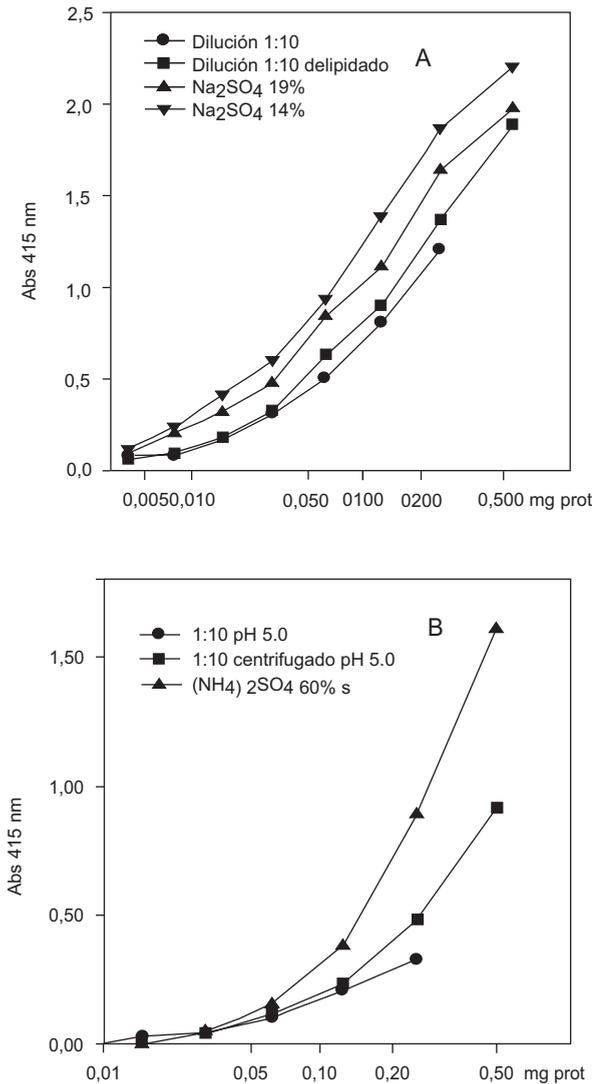


Figura 4. Ensayos de ELISA de las fracciones obtenidas en la deslipidificación de los extractos: (A) fracciones extracto a pH 6,2; (B) fracciones extracto a pH 5,0.

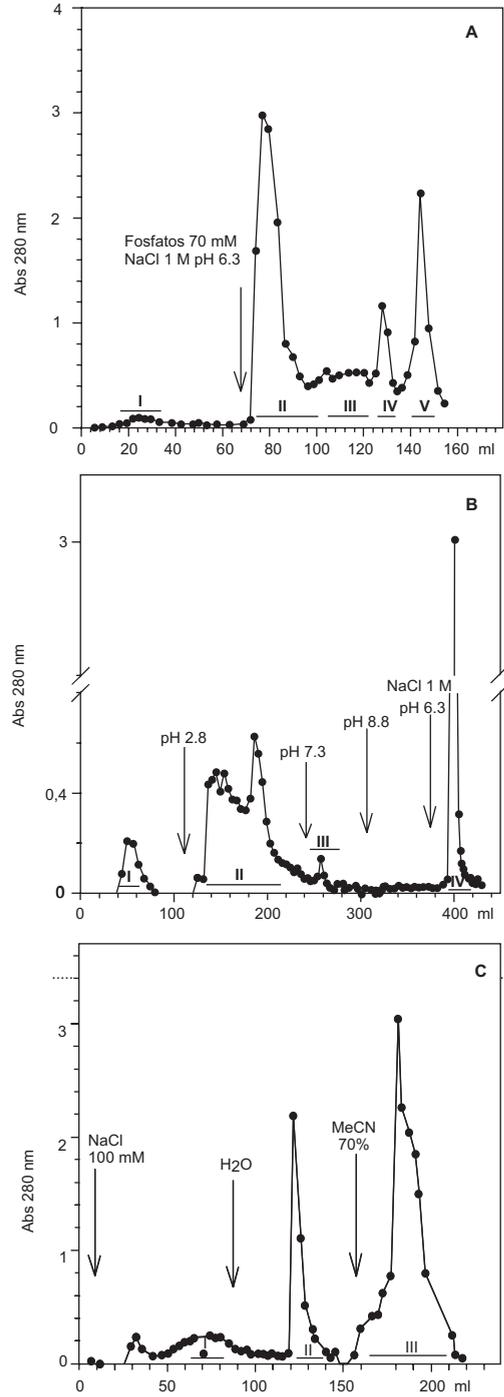


Figura 5. Cromatografías sobre DEAE-Sephacel: (A) extracto sin acidificar; elución por fuerza iónica. (B) extracto acidificado; elución por gradiente discontinuo de pH. (C) cromatografía sobre fenil-Sepharosa 4B del extracto deslipidado sin acidificar.

Cuadro 2. Cuantificación de proteína en las fracciones provenientes de las cromatografías.

Fracción	Proteína en fracción (mg)	Proteína recuperada (mg)	Proteína sembrada (mg)	Recuperación (%)
* DEAE sin acidificar NR	0,188			
* DEAE sin acidificar II	0,862	1,258	8,2	15,3
* DEAE sin acidificar III	0,208			
* DEAE acidificando NR <i>pool</i>	1,785			
** DEAE acidificando NR máximo	1,389			
** DEAE eluido 2,8 <i>pool</i>	5,282			
** DEAE eluido 2,8 fr a	0,300	12,272	23,0	53,0
** DEAE eluido 2,8 fr b	0,391			
** DEAE eluido 2,8 fr c	0,457			
** DEAE eluido 2,8 fr d	1,086			
** DEAE eluido 7,3	0,252			
** DEAE eluido 1 M	1,330			
* S-200	0,196	0,196	2,7	7
* S-500 I	0,015	0,262	0,9	28,7
* S-500 II	0,248			
* Fenil-sefarosa NR	0,017	0,429	3,6	11,7
* Fenil-sefarosa- Agua	0,412			
* T-gel sin acidificar NR	0,092	0,168	2,7	6,1
* T-gel sin acidificar Ret	0,076			
** T-gel acidificando NR	8,66	11,37	11,8	96,0
** T-gel acidificando Ret	2,71			

* Proteína determinada por Bradford

** Proteína determinada por BCA

NR: no retenido

Ret : retenido

de *S. bogotensis* (21); en la figura 5B se presenta el perfil cromatográfico obtenido. Se encontró un pico no retenido pequeño (I) y tres picos no resueltos al eluir con tampón glicina-HCl, pH 2,8, (fracción II). A pH 7,3 se eluyó un pico muy pequeño y a pH 8,8 no eluyó ningún pico. Por último, la elución con tampón de alta fuerza iónica (pH 6,3, 1 M NaCl) resultó en un pico bien definido con una alta absorbancia. Con cada fracción eluída se hizo un *pool*, a excepción de los tubos con valores máximos a pH 2,8, que se recolectaron por separado. Los ensayos de detección por *Dot-blot* mostraron la presencia de IgY en las alícuotas del pico eluido a pH 2,8. Observando los perfiles cromatográficos con DEAE-Sephacel, se deduce que algunos de los contaminantes presentes debían tener puntos isoelectrónicos similares al pI de las IgY (22); el perfil electroforético mostró (figura 6B, carriles 4 y 5) que, aunque se redujeron sustancialmente los contaminantes (figura 6B, carriles 2 y 3) y se observan claramente las cadenas H (70 kd) y L (25 kd), la pureza fue sólo parcial.

Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular sobre Sephacryl S-200 del extracto final deslipidado sin acidificar (2,7 mg de proteína). En el perfil cromatográfico se observó que la proteína eluyó prácticamente en un solo pico, en un volumen algo mayor que el V_0 , sin separarse de los contaminantes detectados por PAGE-SDS (resultados no mostrados). Por ello se utilizó un soporte de Sephacryl S-500 en el que se resolvieron tres picos, y los dos primeros fueron muy pequeños. Dado que prácticamente toda la proteína del extracto se eluyó en un solo pico y que, además, éste fue asimétrico, lo cual indica heterogeneidad, como se demostró por electroforesis (figura 6A, carril 7), se puede concluir que con este soporte no se logró un fraccionamiento adecuado.

Se ensayó una cromatografía hidrofóbica sobre fenil-sefarosa 4B del extracto final deslipidado sin acidificar (3,6 mg de proteína). Se obtuvo una fracción no retenida muy pequeña (fracción I, figura 5C), una fracción al eluir con agua (II) y una

tercera fracción (III) de aspecto turbio, al pasar MeCN sobre la columna. A las fracciones I y II se les determinó la cantidad de proteína (cuadro 2); la electroforesis de II mostró como bandas predominantes las cadenas H y L de las IgY, junto con una cantidad apreciable de contaminantes (figura 6A, carril 6).

Cuando se aplicó sobre el soporte tiofílico la fracción deslipidada con acidificación (11,8 mg), el perfil cromatográfico mostró una fracción no retenida considerable (figura 7A, fracción I); al disminuir la fuerza iónica se obtuvo un pico de IgY, evidenciado por ELISA, bien definido y con

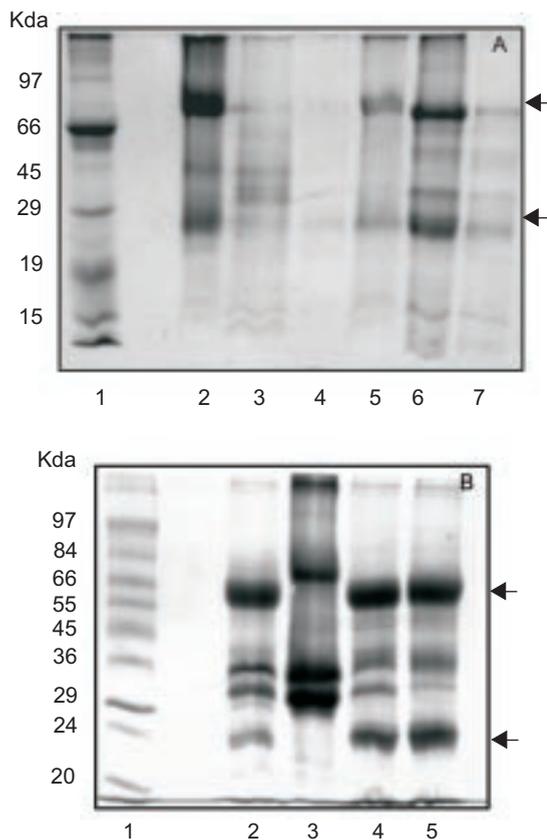


Figura 6. Análisis por PAGE-SDS de (A) fracciones de extracto sin acidificar. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: extracto pH 6,2; 3: fr I DEAE-Sephacel; 4: fr II DEAE-Sephacel; 5: fr III DEAE-Sephacel; 6: fr II Phenyl-Sepharose; 7: fr III Sephacryl S-500. (B) fracciones por DEAE-Sephacel de extracto acidificado. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: extracto pH 5,0; 3: pico no retenido; 4: pH 2,8 fracción a; 5: pH 2,8 fracción b. Las flechas indican la posición de las cadenas H y L.

una alta absorbancia indicadora de una buena cantidad (figura 7A, fracción II). En esta cromatografía se recuperó 90% de las IgY aplicadas, puesto que al volver a someter a cromatografía el pico I, se obtuvo un pico de IgY bastante pequeño cuya Abs_{280} fue de 0,260 (0,29 mg) y por *Dot-blot* no se detectó IgY en el pico no retenido (figura 7B, *dots* 5 y 7), aun con cantidades 6 veces mayores que las del retenido (3,2 μ g vs. 0,5 μ g, figura 7B, *dots* 5 y 6). Esta recuperación coincide con la observada por otros autores (29) utilizando este soporte. El extracto proveniente de la dilución con agua sin acidificar (2,7 mg de proteína) se corrió también sobre el soporte tiofílico, observándose un perfil muy similar (datos no mostrados) con una fracción eluída a baja fuerza iónica (IgY) que, aunque menor que la no retenida, posee una absorbancia alta.

Con la cromatografía tiofílica se observó que a partir del extracto inicial se obtenían IgY prácticamente puras (figura 7C, carril 3) en un solo paso cromatográfico, ya que se eliminaron los contaminantes presentes en el extracto inicial (figura 7C, carriles 2 y 4) para, finalmente, obtener las IgY con sus cadenas livianas y pesadas.

La reactividad de las IgY obtenidas por afinidad sobre cromatografía tiofílica (0,763 mg/ml) se evaluó adicionalmente por ensayo de ELISA y *Dot-blot*. Por *Dot blot* se observó reactividad hasta una dilución de 1:10000 (1,2 μ g de lectina por punto) (figura 8A); los resultados muestran un reconocimiento de la lectina por parte del Ab hasta un valor límite de 0,076 μ g/ml de anticuerpo, lo cual indica una alta sensibilidad. Por ensayo de ELISA se observó un incremento importante en la detección de lectina (1,5 μ g) con 10 μ g de anticuerpo puro (IgY) respecto al extracto crudo (figura 8B), lo que indica que el grado de purificación del anticuerpo alcanzado con este método fue considerable. Con cantidades mayores a 12 μ g de IgY pura se observó una disminución de la reacción Ag-Ab (figura 8B).

Discusión

La respuesta inmune obtenida con la lectina de *S. bogotensis*, además de mostrar la correlación esperada entre dosis de antígeno aplicada y cantidad de inmunoglobulina producida, presentó

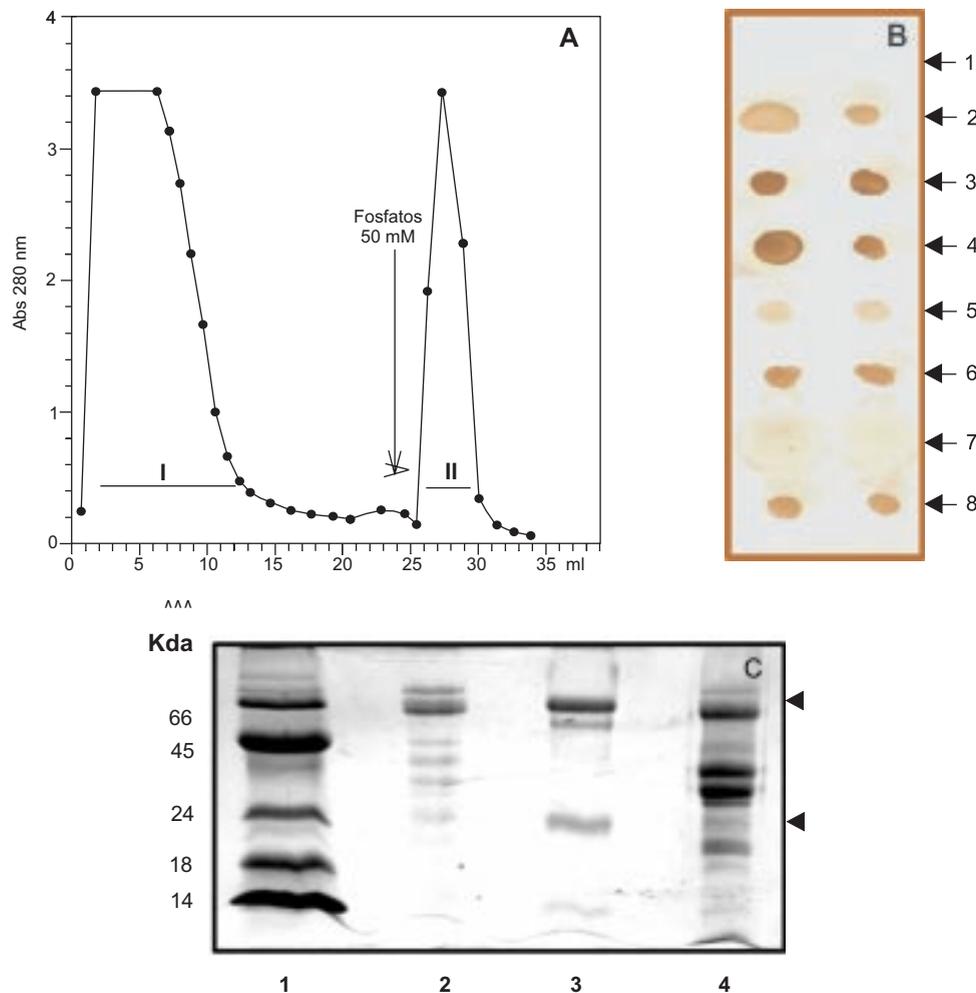


Figura 7. (A) Cromatografía tíoica del extracto deslipidado a pH 5,0. (B) Detección de IgY por *Dot blot* de las fracciones no retenidas (*dot* 5: 3,2 µg; *dot* 7: 1,85 µg), retenidas (*dot* 3:2,7 µg; *dot* 4: 3,6 µg; *dot* 6: 0,5 µg; *dot* 8: 1,45 µg); control (1) y extracto inicial (*dot* 2: 4,4 µg). (C) PAGE-SDS de las fracciones de la cromatografía tíoica. Carriles 1: patrones de peso molecular; 2: extracto deslipidado; 3: fracción II; 4: fracción I.

una persistencia superior a 70 días, lo cual implica una cantidad considerable de material disponible para aislar las IgY. Resultados similares han sido obtenidos por Gassmann *et al.* (2), Jensenius y Koch (22) y Chen *et al.* (32).

Entre los métodos de deslipidación y extracción de IgY, la precipitación con PEG 8000 permite una buena recuperación de IgY con pocos contaminantes; sin embargo, su remoción, necesaria para los análisis posteriores, es difícil. Se ha utilizado la precipitación de las proteínas con etanol preenfriado para separarlas del PEG

en solución (12); no obstante, el carácter potencialmente denaturante del etanol puede afectar la actividad de las IgY, lo cual efectivamente se comprobó en los ensayos de actividad por ELISA.

La deslipidación por dilución con agua sin acidificar (23) es un método sencillo y rápido (extracto final en 2 a 3 días), con el cual se puede procesar un volumen apreciable de yemas, lo que permite la extracción de gran cantidad de anticuerpos en condiciones que no afectan la actividad de las IgY. El gran inconveniente que presenta es la

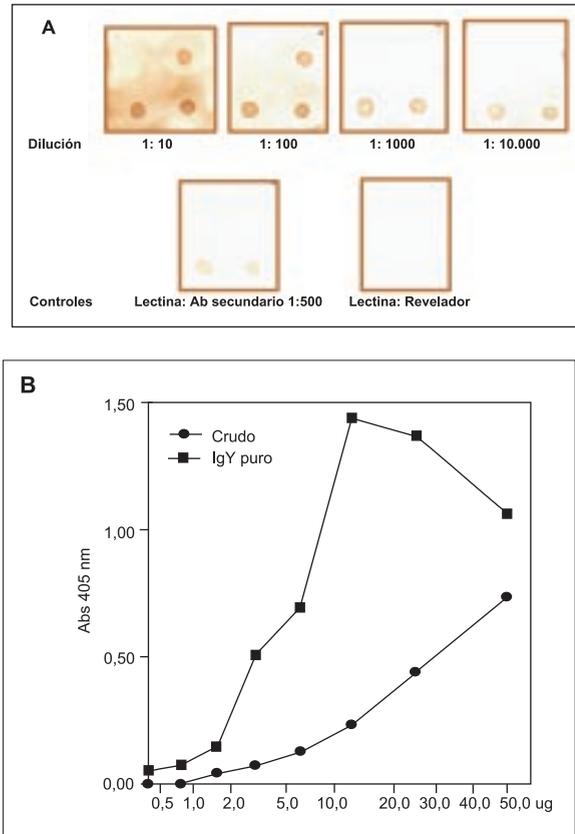


Figura 8. Detección de la interacción lectina *Salvia bogotensis*: IgY por (A) *Dot blot* con diluciones sucesivas del anticuerpo; (B) ELISA del extracto de IgY crudo y del IgY purificado por cromatografía tiofílica.

remoción incompleta de los lípidos de la yema, que pueden interferir en ensayos como la cuantificación de proteína. Teniendo en cuenta esta interferencia, y que el Coomassie G 250 no se une en igual proporción a todas las proteínas (25), es posible que la cantidad de proteínas recuperadas por este método se subestime.

Akita y Nakai (24) mostraron que el método de dilución con agua puede optimizarse acidificando la solución a pH 5,0. Nuestros resultados muestran que este método es el mejor procedimiento de delipidación y extracción pues, además de ser sencillo, preservó muy bien la actividad de las IgY, se obtuvieron las mejores recuperaciones de proteína, se eliminaron los contaminantes de alto PM y el número de proteínas contaminantes de bajo PM no fue muy elevado (4-5).

En los ensayos de purificación con DEAE-Sephacel vale la pena resaltar el hecho de que con este tipo de cromatografía, las IgG se eluyen siempre en la fracción no retenida (27) y las altas fuerzas iónicas eluyen otras proteínas y pigmentos, mientras que las IgY son retenidas en este soporte; probablemente las diferencias en pI de los dos tipos de inmunoglobulinas explican este comportamiento. La purificación incompleta que observamos corrobora los resultados de otros autores (24), quienes aseveran que con este método sólo se alcanza una pureza de 50% a 60%. En consecuencia, aunque la cromatografía de intercambio aniónico es capaz de retener grandes cantidades de proteína (150 mg albúmina/ml gel), debe acompañarse de otros métodos de purificación.

Según Hassl y Aspöck (28), al combinar la cromatografía hidrofóbica con la cromatografía sobre Sephacryl S-300 (rango de exclusión 10 a 1500 kDa), se obtienen anticuerpos con purezas mayores a 85%. Sin embargo, nosotros observamos que combinando estos dos métodos no es posible aumentar la pureza de las IgY, aunque se utilice el Sephacryl S-500 que tiene mayor poder de resolución que el Sephacryl S-300.

Según Scoble y Scopes (33), la activación del soporte con DVS debe realizarse, por lo menos, durante 8 horas para que el soporte tiofílico (T-gel) llegue al nivel óptimo de retención (± 26 mg de anticuerpo/ml de gel); los resultados con la muestra acidificada que se corrió sobre una columna activada durante 8 horas lo confirman, ya que la cantidad de anticuerpo retenida fue considerable (cuadro 2).

El análisis de los datos del cuadro 2 muestra que en varios casos sólo entre 6% y 15% de la proteína aplicada se recupera. Esto podría deberse, por una parte, a la interferencia de los lípidos residuales presentes en los extractos sin acidificar y, por otra parte, a la cuantificación por el método de Bradford, que según Hansen *et al.* (29) subestima la cantidad de IgY hasta en 50%. Esto se corrobora por el hecho de que cuando se aplican extractos acidificados y se cuantifica por BCA, la recuperación aumenta muchísimo, como

en el caso de la cromatografía tiofílica de la muestra acidificada (96%), o en la cromatografía sobre DEAE-Sephacel del extracto acidificado (53%).

El conjunto de resultados obtenidos con los ensayos de purificación mostraron que la cromatografía tiofílica de la muestra acidificada es el mejor método, ya que permitió obtener IgY prácticamente puras con muy buenos rendimientos usando un proceso sencillo y muy reproducible, con el cual se preservó la actividad de los anticuerpos.

Los resultados globales del trabajo permiten afirmar que se establecieron los mejores procedimientos para deslipidar, extraer y obtener eficientemente IgYs de muy buena calidad.

Los anticuerpos así obtenidos y purificados han demostrado ser una herramienta muy útil en estudios de reconocimiento del antígeno Tn en líneas celulares tumorales por parte de la lectina de *S. bogotensis* (21), y serán utilizados en estudios inmunohistoquímicos y de interacciones con células mediadas por la lectina.

Agradecimientos

Al veterinario Fabio Ortiz (granja avícola La Colina, Subachoque) por facilitar los animales y las instalaciones para los ensayos de inmunización.

Conflicto de intereses

En la realización de esta investigación no hubo conflicto de intereses, pues ninguna influencia económica o política incidió en sus resultados.

Financiación

Colciencias (Proyecto 1101-05-13602) y División de Investigaciones de la Universidad Nacional (Proyecto 205011003540).

Referencias

1. **Akita EM, Nakai S.** Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J Immunol Methods* 1993;162:155-64.
2. **Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U.** Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J* 1990;4:2528-32.
3. **Wu C, Yang J, Zhou J, Bao S, Zou L, Zhang P et al.** Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase I. *J Immunol Methods* 2003; 277:157-69.
4. **Cook C, Pao W, Firca JR, Anderson BE, Fryer JP.** Simple Purification Methods for an aGalactose-Specific antibody from chicken eggs. *J Biosci Bioeng* 2001;91: 305-10.
5. **Bizhanov G, Vyshniauskis G.** A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. *Vet Res Commun* 2000; 24:103-13.
6. **Almeida CM, Kanashiro MM, Rangel FB, Mata MFR, Kipnis TD, da Silva WD.** Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. *Vet Rec* 1998;143:579-84.
7. **Narat M.** Production of antibodies in chickens. *Food Technol Biotechnol* 2003;41:259-67.
8. **Warr GW, Magor KE, Higgins DA.** IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995; 16:392-8.
9. **Zhang WW.** The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discov Today* 2003;8: 364-71.
10. **Rose ME, Orlans E, Buttres N.** Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur J Immunol* 1974;4:521-3.
11. **Carroll SB, Stollar BD.** Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983;258:24-6.
12. **Polson A, Coetzer T, Krugar J, von Maltzahn E, van der Merwe KJ.** Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest* 1985;14:323-7.
13. **Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjöquist J.** Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. *Clin Chem* 1991; 37:411-4.
14. **Kronvall G, Seal US, Finstad J, Williams RC Jr.** Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of γ G globulin using staphylococcal protein A. *J Immunol* 1970;104:140-7.
15. **Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, Lindahl T.** Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods* 1992;156:79-83.
16. **Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C.** Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981; 46:63-8.
17. **Dahr W, Uhlenbruck G, Bird GW.** Cryptic A-like receptor sites in human erythrocyte glycoproteins: proposed nature of Tn Antigen. *Vox Sang* 1974;27:29-42.

18. **Berger E.** Tn-Syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455:255-68.
19. **Hirohashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y, Hakomori S.** Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC Lu-35 and 81 expressed in cancer of blood group O or b individuals. Its identification as "Tn antigen". *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7039-43.
20. **Springer GF.** T and Tn, general carcinoma auto-antigens. *Science* 1984;244:1198-206.
21. **Vega N.** Caracterización bioquímica, funcional y biológica de la lectina de *Salvia bogotensis* (tesis). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
22. **Jensenius JC, Koch C.** Antibodies packaged in eggs. En: Johnstone AP, Turner MW, editors. *Immunochemistry I: A practical approach*. Oxford: IRL Press Oxford University Press; 1997.p:89-107.
23. **Akita EM, Nakai S.** Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* 1993;160:207-14.
24. **Akita EM, Nakai S.** Immunoglobulins from egg yolk: Isolation and purification. *J Food Sci* 1992;57:629-34.
25. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
26. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
27. **Baines G, Thorpe R.** Purification of Immunoglobulin G(IgG). In: Manson M, editor. *Immunochemical Protocols. Methods in molecular biology*. Totowa New Jersey: Humana Press; 1992. p.79-103.
28. **Hassl A, Aspöck H.** Purification of egg yolk immunoglobulins. A two-step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *J Immunol Methods* 1988;110:225-8.
29. **Hansen P, Scoble JA, Hanson B, Hoogenraad NJ.** Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *J Immunol Methods* 1998;215:1-7.
30. **Hermanson GT, Mallia A, Smith P.** Immobilized affinity ligand techniques. San Diego: Academic Press; 1992. p.110-6.
31. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
32. **Chen CC, Tu YY, Chen TL, Chang HM.** Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white Lysozyme by immunoaffinity chromatography. *J Agr Food Chem* 2002;50:5424-8.
33. **Scoble JA, Scopes RK.** Ligand structure of the divinylsulfone-based T-gel. *J Chromatogr A* 1997;787: 47-54.