

卵黄抗体(IgY)及其在蛇伤治疗中的研究进展*

王文文, 和七一, 刘刚, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心
教育部活性物质生物技术工程研究中心, 重庆 401331)

摘要:传统抗蛇毒血清存在生产成本高、得率低、多种副作用等不足,使得寻找更理想的蛇毒解毒剂变得十分迫切;因卵黄抗体(IgY)在生产及中和蛇毒毒性等方面所体现的独特优势,成为开发新蛇毒解毒剂的重要研究对象。当前研究表明:IgY与哺乳动物IgG功能相似但结构不同;IgY据有良好的耐压及耐酸碱稳定性,但对高温及蛋白酶敏感;相比IgG,IgY的生产成本低且具有非侵略性,其运用于免疫分析可降低假阳性率;产蛋鸡的免疫应答受抗原(剂量、分子量)、佐剂类型、免疫途径、免疫间隔等4种主要因素共同影响;纯化方法影响IgY纯度与活性;已制备出的多种抗蛇毒IgY对蛇毒引起的毒理作用有很好的中和效果。随着生物技术的快速发展,抗蛇毒IgY有望被开发成解毒剂、诊断试纸、亲和配体、口服制剂等,在蛇伤研究领域的应用前景广阔。

关键词:解毒剂;卵黄抗体(IgY);抗蛇毒IgY

中图分类号:R392.5;Q939.91

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2015)06-0046-07

地球上现生存有2340种蛇,其中超过420种为有毒蛇^[1]。蛇伤是一个重大的公共健康问题,也是一个被忽视的主要的热带疾病^[2]。2008年的有关研究显示,全球每年有高达1841000例毒蛇咬伤事件发生,导致94000人死亡^[3],而蛇伤致残的比例远高于致死。

胃肠外注射动物源性抗蛇毒血清是世界范围内治疗蛇伤的基础^[2],抗毒血清也被公认为是治疗蛇伤的唯一特效药^[4];然而生产的高成本、长周期、诸多副作用(如过敏性休克、致热反应及血清病)等现状^[5]凸显了当前抗毒血清在生产和运用方面所面临的窘境,这也使得“寻找其他解毒剂”的想法油然而生。廉价、高产、安全、具非侵略性的抗蛇毒卵黄抗体(Immunoglobulin of egg yolk, IgY)能有效中和由蛇毒引起的多种毒理学效应,因此,它被认为是一种可能替代抗蛇毒血清的新型解毒剂。本文就IgY的特性、优点、生产及抗蛇毒IgY在蛇伤治疗领域的研究进展进行综述,为该抗体在此研究领域的进一步应用提供参考。

1 IgY的结构与特性

1.1 IgY的结构

IgY是禽类在特异性抗原刺激下,由体内B淋巴细胞产生并转移至卵黄以提供给新生个体被动免疫的多克隆抗体,它是卵黄中唯一存在的抗体,功能类似于哺乳动物IgG。IgY同IgG在整体结构上相似,均由两条相同的轻链和重链共价连接而成,但二者存在细微差异(图1):1) IgY的分子量(约180 kD)大于IgG(约150 kD);2) IgG的轻链含二硫键而IgY则无;3) IgY的构型较IgG更加无序^[6];4) IgY中无铰链结构而IgG有^[7]。

1.2 IgY的特征

IgY的pI值为5.7~7.6,而IgG的pI值为6.1~8.5。IgY疏水性比IgG强^[8]。酸碱稳定性试验表明,pH值在3.5~11时IgY活性稳定;酶解实验表明,IgY对胰蛋白酶和糜蛋白酶有相对的抗性,对胃蛋白酶十分敏感,且敏感性随酸性增加而增强;热稳定实验表明,升高温度和延长热处理时间均会导致抗原与IgY的结合能力降低,热处理温度超过75℃将导致抗体失活^[6],糖类添加剂可增强IgY热稳定性^[9];压力实验表明,IgY具有一定抗压性;反复冷冻干燥处理会影响IgY活性,导致其与抗原结合能力下降。

* 收稿日期:2015-03-04 修回日期:2015-04-17 网络出版时间:2015-9-28 12:16

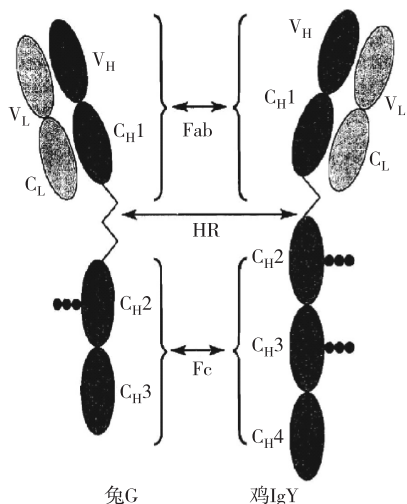
资助项目:重庆市林业局渝林科研2015-5;重庆市自然科学基金(No. CSTC2014yykfA110019)

作者简介:王文文,女,研究方向为生物毒素与药物研发,E-mail:269250955@qq.com;通信作者:余晓东,教授,E-mail:yxd@cqnu.edu.cn

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.n.20150928.1216.026.html>

2 IgY 的优点

相较于哺乳动物 IgG,生产 IgY 更具优势(表 1):1) 鸡蛋收集简单易行且“非侵略性”;2) 鸡与哺乳动物之间的亲缘间距较哺乳动物种类间更远,少量的哺乳动物蛋白往往能刺激产蛋鸡产生更强的免疫应答^[10];3) 1 只产蛋鸡每年的 IgY 产量是 1 只兔子 IgG 产量的 4.3 倍^[10-11];4) 产蛋鸡的饲养成本更低^[11-12];5) IgY 不激活补体系统,不与蛋白 A 和 G 反应,不与哺乳动物免疫球蛋白反应,不与 HAMA、RF 反应,这使得 IgY 在医学领域(如异种移植、免疫诊断等)的运用极具优势^[11]。相较于抗生素,IgY 更称得上是一种“环境友好型”的资源,它不会引起副作用、毒素残留以及抗药性^[13]。



注:V:轻链可变区(V_L)及重链可变区(V_H);C:轻链恒定区(C_L)及重链恒定区(C_H);HR:铰链;Fab:抗原结合域;Fc:可结晶片段。黑圆点代表糖链;本图引用自文献^[6]。

图 1 鸡 IgY 与兔 IgG 分子结构的比较

Fig. 1 Comparison of the molecular structure of chicken IgY and rabbit IgG

表 1 兔 IgG 与鸡 IgY 特性比较

Tab. 1 Comparison thethe characteristics of rabbit IgG and chicken IgY

比较项目	兔 IgG	鸡 IgY
饲养成本	高	低
抗体采集	侵略性	非侵略性
抗体来源	血清	卵黄
分离难易程度	复杂	快速简单
特异性抗体含量	5%	2%~10%
每年抗体数量产量	5 200 mg	22 500 mg
与保守性哺乳动物蛋白抗原反应	反应强度因同源性高而降低	强烈快速
结合蛋白 A/G	能	不能
与哺乳动物免疫球蛋白反应	能	不能
与 HAMA 反应	能	不能
与类风湿因子(RF)反应	能	不能
活化补体	能	不能

注:此表改编自文献^[10]。

3 IgY 的生产

用某种抗体免疫产蛋鸡能刺激其产生免疫应答,生成特异性抗体(IgY),该抗体被专一的从血液转移至卵黄,并在卵黄中富集,通过收集鸡蛋,分离卵黄,便可源源不断的获得特异性抗体,用于免疫诊断、免疫预防、免疫治疗等(图 2)。

3.1 蛋鸡免疫

抗体的生产受抗原(剂量、分子量)、佐剂类型、免疫途径、免疫间隔等主要因素共同影响。抗原可以是多聚(如细菌、病毒和寄生虫)也可以是单一(蛋白质或多糖)形式。蛋白质被认为是最有效的抗原^[14]。研究表明,抗原剂量在 10~1 000 μg 之间可激发最强的免疫应答^[9,15]。佐剂能增强机体的免疫应答,目前可用免疫的佐剂超过 100 种^[16],其中,弗氏完全佐剂(FCA)被认为是最有效的佐剂。弗氏不完全佐剂(FIA)的效能低于 FCA,但它对免疫动物所造成的伤害更低,因此常将 FCA 与 FIA 结合使用^[17]。传统免疫途径包括肌肉、皮下、静脉、腹腔注射等,其中,肌肉注射是最常被采用的免疫途径,胸肌是最常被选择的免疫部位^[11]。近几年来,口服免疫^[18]以及“基因枪”法免疫^[19-20]也被运用于 IgY 的研究。成功的免疫在一定程度上依赖于免疫间隔的长度。一般而言,

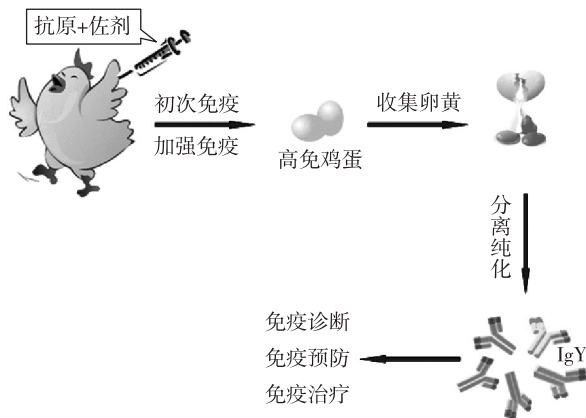


图 2 特异性 IgY 生产流程图

Fig. 2 The production flow chart of specific IgY

14~28 d 的间隔比较适合,过短的免疫间隔会导致免疫应答被抑制而不是活化^[21]。Schade 等人^[11]集思广益,归纳总结了多种免疫变量的有效范围(表 2),该成果具有一定的参考价值。

3.2 IgY 的纯化

卵黄球蛋白(α -、 β -及 γ -卵黄蛋白)是存在于卵黄中的水溶性糖蛋白,IgY 构成 γ -卵黄蛋白的主体^[22]。IgY 的纯化大体历经 3 步:水溶性组份的分离、IgY 的提取、IgY 的精制。

3.2.1 水溶性组份的分离 此步的目的即去脂。去脂的方法很多,常用的包括水稀释法、聚乙二醇(PEG)沉淀法、有机溶剂(氯仿、辛酸等)抽提法、冻融法等。

3.2.2 IgY 的提取 对 IgY 的水溶性组份进一步处理(表 3),可获得纯度较高的 IgY 粗提物。

Akitah 和 Nakai^[23]采用“稀释法-19%硫酸钠沉淀”法,得到纯度为 82%、回收率为 83%的 IgY 样品。Andrade 等人^[24]采用“稀释法-35%硫酸铵沉淀”法,所纯化的 IgY 活性高、特异性强。Polson 等人^[25]最先使用 PEG 法纯化 IgY,此法经 Pauly 等人^[26]改良后,样品纯度及回收率均有所提高。PEG 法简单易行,被认为是最有效 IgY 纯化法。冰乙醇沉淀是一种典型的有机溶剂沉淀法,张述斌等人^[27]采用“稀释-氯仿萃取-40%冰乙醇沉淀”法,得到了高纯度、高效价的特异性 IgY。Kim 和 Nakai^[28]使用 Amicon UF 系统直接从水溶性组份中分离 IgY,分离效果理想。

3.2.3 IgY 的精制 IgY 粗提物由于纯度相对较低,仅能满足口服预防及治疗的需求,如运用于免疫注射,必须进行精制处理。IgY 的精制往往采用色谱技术,除选择传统的单一色谱分离 IgY 之外^[4,29-33],新型混合模式色谱(Mixed-mode chromatography, MMC)如疏水电荷诱导色谱(Hydrophobic charge induction chromatography, HCIC)^[34-35]也被运用到 IgY 的纯化中且分离效果显著。

IgY 技术的快速发展大大推动了 IgY 纯化试剂盒的研发,目前,已有多种纯化试剂盒问世(如 Thermo Pierce's EggcellentTM、Promega's EGG stract[®]等)^[36]。尽管使用试剂盒纯化抗体步骤简单、周期短、效果好,但其昂贵的价格及有限的处理量极大地阻碍了它们在 IgY 规模化生产中的应用。目前,这类产品主要被用于如实验室水平上 IgY 的小规模生产。

3.3 IgY 的保存

添加防腐剂(如质量体积比为 0.02%叠氮化钠、质量体积比为 0.03%硫汞撒或者 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的庆大霉素)可延长 IgY 溶液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下的保存期限。IgY 溶液如需低温保存,应在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。IgY 粉末在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下可保存半年,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下可保存 5~10 年之久。

4 抗蛇毒 IgY 的研究进展

4.1 抗蛇毒 IgY 基础性研究

自 IgY 被发现后一个多世纪以来,国内外已成功制备出抗不同种类抗原(包括人和动物的某些疾病的病原体以及细胞、激素、各种蛋白等)的 IgY,并有部分种类的 IgY 被开发利用,其中美国、日本、德国等国在 IgY 的研究开发中处于领先地位。如今,市场上可见多种大量添加 IgY 产品(如发酵酸奶、功能型食品、卫生消毒产品、化妆品、新型饲料等)。临床研究显示,IgY 在医疗诊断及治疗方面也极具潜力。

1990 年 Thalley 等人^[37]首次报道抗蛇毒卵黄抗体的制备研究,他们采用亲和层析方法从鸡卵黄中纯化出抗铜头蝮(*Agkistrodon contortrix*)、食鱼蝮(*A. piscivorus*)、西部菱斑响尾蛇(*Crotalus atrox*)及东部菱背响尾蛇(*C. adamanteus*)等蛇毒的 4 价 IgY,其重链分子量为 66 000 kD,轻链分子量为 24 000 kD。所纯化的 IgY 能有

表 2 蛋鸡免疫条件推荐

影响因素	免疫条件	建议
抗原	0.10~1.00 mg	有时可能只需 10 μg
佐剂	FIA 0.10~0.25 mL	通常经肌肉或皮下注射
	Specol 0.5 mL	经皮下注射
	PCSL 250 μg	经皮下注射
	FCA 0.10~0.25 mL	同免疫原性弱的抗原乳化使用
体积	0.5~1 mL	
间隔	28~56 d	
次数	至少 2 次	
途径	肌肉、皮下或静脉	

注:本表引用自 Schade 等人^[11]的论文。

表 3 IgY 粗提方法归纳

方法	参考文献
无机物沉淀法	Akitah 和 Nakai ^[23] ; Andrade 等人 ^[24]
高分子有机聚合物沉淀法	Polson 等人 ^[25] ; Pauly 等人 ^[26]
有机溶剂沉淀法	张述斌等人 ^[27]
超滤法	Kim 和 Nakai ^[28]

效中和西部菱斑响尾蛇毒对实验小鼠的致死效应,其中和能力是商用马源型抗体的 6.3 倍^[38]。由于抗蛇毒 IgY 具有很好的中和效果,因此它引起了人们的广泛关注,近些年来有关抗蛇毒 IgY 的研究结果^[4,24,29,32-33,39-45] 参见表 4。由此可见,用蛇毒免疫蛋鸡可获得高活性的抗蛇毒 IgY,它不仅能有效中和蛇毒的致死效应,也能中和蛇毒引起的其他效应(如出血、水肿、促凝、肌溶等),并且具有较好的耐热、耐酸及抗胰蛋白降解性质。

4.2 抗蛇毒 IgY 的临床研究进展

将抗蛇毒 IgY 成功用于临床治疗的例子极少,至今只有 1 篇来自越南的相关报道发表^[46]。在该报道中,研究人员使用抗红口蝮(*Calloselasma rhodostoma*)蛇毒 IgY 治疗被该蛇咬伤的 30 位患者。由于实验的样本数目太少,科研人员无法仅依据实验结果就抗蛇毒 IgY 在临床运用的安全性及高效性做出科学的判定^[47]。Díaz 等人^[48]对次此报道持怀疑态度,一是之后没有任何关于此 IgY 的文献跟进,二是大量近期资料显示越南当年所生产的抗体都来源于马血清,包括抗红口蝮蛇毒的抗体在内。在台湾,科研人员通过免疫鸭子,从鸭蛋中分离出抗眼镜蛇毒 IgY,相关临床试验正在进行当中。

表 4 IgY 在蛇伤治疗领域的研究成果

Tab. 4 Researches of IgY in the field of treatment for snake envenomation

蛇毒种类	纯化方法	IgY 类型	效价	参考文献
印度眼镜蛇(<i>Naja naja naja</i>)	稀释法-硫酸铵沉淀-亲和色谱	单价	构建了以 IgY 为基础的间接双抗体夹心 ELISA,可检测出质量为 0.1~300 ng 的印度眼镜蛇蛇毒,灵敏度高	Brunda 等人 ^[32]
锯鳞蝰(<i>Echis carinatus</i>)	水稀释法-硫酸铵沉淀-亲和色谱	单价	能有效中和 2×LD ₅₀ 蛇毒抗原的致死效应	Paul 等人 ^[33]
眼镜蛇(<i>N. naja</i>)、 圆斑蝰(<i>Daboia russelli</i>)、 锯鳞蝰(<i>E. carinatus</i>)、 印度环蛇(<i>Bungarus scaeruleus</i>)	PEG 法-硫酸铵沉淀-离子交换色谱	单价	4 种 IgY 均能有效中和对应蛇毒抗原引起的出血、间接溶血、水肿、促凝及致死效应	Meenatchisundaram 等人 ^[4,29]
蝮蛇属(<i>Bitis</i>)、 眼镜蛇属(<i>Naja</i>)	水稀释法-硫酸铵沉淀	单价和 二价	IgY 滴度及中和能力随免疫进行而变大;抗鼓腹蝮蛇(<i>Bitis arietans</i>)蛇毒 IgY 能完全中和 62.2×LD ₅₀ 鼓腹蝮蛇蛇毒的致死效应	Almeida 等 ^[39]
矛头蝮属(<i>Bothrops</i>)	PEG 法;辛酸法; 水稀释法-硫酸铵沉淀	多价	水稀释法去脂较 PEG 法和辛酸法得率更高;20% 硫酸铵沉淀的效果最好;IgY 能有效中和 2×LD ₅₀ 蛇毒的致死效应	Araújo 等人 ^[40]
非洲角蝰(<i>Cerastes cerastes</i>)、 沙漠眼镜蛇 (<i>Walterinnesia aegyptia</i>)	方法一:水稀释法-硫酸铵沉淀;方法二: 辛酸法-硫酸铵沉淀	单价	两种 IgY 均能完全中和(10~50)×LD ₅₀ 对应蛇毒抗原的致死效应;方法一制备的 IgY 样品蛋白含量更高,方法二制备的样品滴度更高	Moussa 等人 ^[41]
矛头蝮属(<i>Bothrops</i>)、 南美响尾蛇 (<i>C. durissus terrificus</i>)	水稀释法-硫酸铵沉淀	单价和 多价	IgY 可识别的抗原种类随免疫时间延长而增多;两类抗体均能有效中和对应蛇毒抗原的致死效应	Andrade 等人 ^[24]
珊瑚蛇属(<i>Micrurus</i>)	冻融法-硫酸铵沉淀	多价	IgY 能与对应的抗原免疫结合,也能同几种非抗原类蛇毒产生免疫交叉反应	Aguilar 等人 ^[42]
中华眼镜蛇(<i>N. atra</i>)	水稀释法-硫酸钠沉淀-离子交换色谱	单价	IgY 能有效保护小鼠免受蛇毒攻击	刘四红等人 ^[43-44]
蝰蛇(<i>Viperidae</i>) 白唇竹叶青 (<i>Trimeresurus albolabris</i>)	水稀释法-硫酸铵沉淀-嗜硫色谱	单价	IgY 与蝰蛇科蛇毒交叉反应显著,与眼镜蛇科(<i>Elapidae</i>)蛇毒交叉反应弱。具有好的耐热、耐酸及抗胰蛋白降解性质。	王桂平等人 ^[45] 段海龙等人 ^[30]

5 展望

相较于哺乳动物 IgG, IgY 的生产成本低、纯化工艺简单、产品纯度高、产量大、稳定性好, 并且引发副作用的可能性更低, 因此, IgY 是一种极富前景的蛇毒解毒剂资源。除了可能替代传统血清治疗蛇伤外, IgY 还有望在其他蛇伤研究领域发挥重要作用: 1) 用于免疫诊断。当重度蛇伤患者或普通患者因无法准确描述对其实施攻击的毒蛇的形态或具体特征时, 使用由多种单价抗蛇毒 IgY 制备的诊断试纸就能帮助医生快速准确的确定毒蛇的种类并实施有针对性的治疗。2) 用于免疫组织化学分析。将偶联荧光染料的抗蛇毒 IgY 用于蛇伤组织的研究, 有助于加深研究人员对蛇毒毒素破坏机制的认识。3) 用于亲和层析。将特异性的 IgY 与填料偶联, 采用亲和层析便可从粗毒中专一地分离出对应的蛇毒抗原组份。4) 如能有效解决“IgY 无法克服人类胃肠道屏障”的难题, 那么通过口服抗蛇毒 IgY 来预防蛇伤的想法将有望实现。

参考文献:

- [1] Lewis R L, Gutmann L. Snake venoms and the neuromuscular junction[J]. *Semin Neurol*, 2004, 24(2): 175-179.
- [2] World Health Organization. Rabies and envenomings: a neglected public health issue; report of a consultative meeting[R]. Geneva: World Health Organization, 2007.
- [3] Kasturiratne A, Wickremasinghe A R, De Silva N, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths[J]. *PLoS medicine*, 2008, 5(11): 1591-1604.
- [4] Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, et al. Neutralization of the pharmacological effects of cobra and krait venoms by chicken egg yolk antibodies[J]. *Toxicon*, 2008, 52(2): 221-227.
- [5] Alvarez A, Montero Y, Jimenez E, et al. IgY antibodies anti-*Tityus caripitensis* venom: purification and neutralization efficacy[J]. *Toxicon*, 2013, 74(2): 208-214.
- [6] Chalghoumi R, Beckers Y, Portetelle D, et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review [J]. *BASE*, 2009, 13(3): 295-308.
- [7] Shimizu M, Nagashima H, Sano K, et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(2): 270-274.
- [8] Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa J, Bastos-Gonzalez D, et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles[J]. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2000, 11(6): 657-673.
- [9] Cook M, Trott D. IgY-immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans [J]. *World's Poultry Science Journal*, 2010, 66(02): 215-226.
- [10] Baloch A R, Zhang X Y, Schade R. IgY Technology in aquaculture—a review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2014(6): 1-8.
- [11] Schade R, Calzado E G, Sarmiento R, et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and veterinary medicine[J]. *Altern Lab Anim*, 2005, 33(2): 129-154.
- [12] Marcq C, Théwis A, Portetelle D, et al. Refinement of the production of antigen-specific hen egg yolk antibodies (IgY) intended for passive dietary immunization in animals: a review[J]. *BASE*, 2013, 17(3): 483-493.
- [13] Xu Y, Li X, Jin L, et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review [J]. *Biotechnology advances*, 2011, 29(6): 860-868.
- [14] Goldsby R A, Kindt T J, Osborne B A, et al. *Immunology* [M]. 5th edition. San Francisco: W H Freeman, 2003.
- [15] Schwarzkopf C, Staak C, Behn I, et al. Immunisation [M]// Schade R, Behn I, Erhard M, et al. Chicken egg yolk antibodies, production and application. Germany: Springer-Verlag, 2000: 25-64.
- [16] Stils H F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants[J]. *ILAR Journal*, 2005, 46(3): 280-293.
- [17] Chalghoumi R, Thewis A, Portetelle D, et al. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* in the same egg yolk[J]. *Poultry science*, 2008, 87(1): 32-40.
- [18] Hedlund G P, Hau J. Oral immunisation of chickens using cholera toxin B subunit and Softigen as adjuvants results in high antibody titre in the egg yolk[J]. *In Vivo*, 2001, 15(5): 381-384.
- [19] Witkowski P T, Bourquain D R, Hohn O, et al. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2009, 341(1): 146-153.
- [20] Niederstadt L, Hohn O, Dorner B G, et al. Stimulation of IgY responses in gene gun immunized laying hens by combined administration of vector DNA coding for the target antigen Botulinum toxin A1 and for avian cytokine adju-

- vants[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2012, 382(1):58-67.
- [21] Calzado E G, Marino E, Chavez T S, et al. Extraction of a monospecific coombs-reagent from chicken eggs[J]. *Al-tex*, 2003, 20(1):21-25.
- [22] Kovacs-Nolan J, Mine Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 296(1):199-209.
- [23] Akita E, 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]. *Journal of Immunological Methods*, 1993, 160(2):207-214.
- [24] De Andrade F G, Eto S F, Navarro Dos Santos Ferraro A C, et al. The production and characterization of anti-*bothropic* and anti-*crotalic* IgY antibodies in laying hens: a long term experiment[J]. *Toxicon*, 2013, 66(3):18-24.
- [25] Polson A, Von Wechmar M B, Van Regenmortel M. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens [J]. *Immunological Investigations*, 1980, 9(5):475-493.
- [26] Pauly D, Chacana P A, Calzado E G, et al. IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol(PEG) precipitation[EB/OL]. [2015-03-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21559009/>. DOI: 10.3791/3084.
- [27] 张述斌, 薛掌林, 张洪波, 等. 利用水稀释反复冻溶法, 氯仿萃取法与冷乙醇沉淀法相结合进行鸡新城疫卵黄抗体提取的试验研究[J]. *畜牧兽医杂志*, 2013, 32(1):11-12.
- Zhang S B, Xue Z L, Zhang H B, et al. Study on extraction of chicken ND-IgY combining with water dilution repeated freezing and dissolving method, chloroform extraction and cold ethanol precipitation[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 32(1):11-12.
- [28] Kim H, Nakai S. Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system[J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(3):510-513.
- [29] Meenatchisundaram S, Parameswari G, Michael A, et al. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies[J]. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(8):1067-1073.
- [30] 段海龙, 余晓东, 邓鹭远, 等. 抗白唇竹叶青蛇毒卵黄抗体(IgY)的制备及其稳定性研究[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(6):1074-1077.
- Duang H L, Yu X D, Deng W Y, et al. Study on the development of antibody (IgY) against *Trimeresurus albolabris* venom from hen egg yolk and its physicochemical stability[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2014, 41(6):1074-1077.
- [31] 张茜, 林洪, 党昕, 等. 腐败希瓦氏菌卵黄抗体活性片段的制备及抑菌效果的分析[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(13):75-78.
- Zhang Q, Lin H, Dang X, et al. Production and antibacterial activity evaluation offragments from chicken egg yolk Immunoglobulin against *Shewanella putrefaciens*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(13):75-78.
- [32] Brunda G, Sashidhar R, Sarin R. Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra *Naja naja naja* venom in biological samples of forensic origin[J]. *Toxicon*, 2006, 48(2):183-194.
- [33] Paul K, Manjula J, Deepa E, et al. Anti-*Echis carinatus* venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy[J]. *Toxicon*, 2007, 50(7):893-900.
- [34] Tong H, Lin D, Yao S. Purification of immunoglobulin IgY with hydrophobic charge induction chromatography [J]. *CIESC Journal*, 2011, 62(6):1574-1580.
- [35] Xia H F, Lin D Q, Chen Z M, et al. Purification of immunoglobulin of egg yolk with hydrophobic charge induction chromatography: comparison of operation modes with packed bed and expanded bed[J]. *Separation Science and Technology*, 2012, 47(16):2366-2372.
- [36] Tan S H, Mohamedali A, Kapur A, et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2012, 380(1):73-76.
- [37] Thalley B S, Carroll S B. Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens[J]. *Nature Biotechnology*, 1990, 8(10):934-938.
- [38] Carroll S B, Thalley B S, Theakston R, et al. Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms[J]. *Toxicon*, 1992, 30(9):1017-1025.
- [39] De Almeida C M C, Da Silva C L, Couto H P, et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom[J]. *Toxicon*, 2008, 52(2):293-301.
- [40] Araújo A, Lobato Z, Chávez-Olórtegui C, et al. Brazilian IgY-*Bothrops* antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk[J]. *Toxicon*, 2010, 55(4):739-744.
- [41] Moussa I M, Hessian A M, Aleisa A M, et al. Protective efficacy of immunoglobulins Y prepared against *Cerastes cerastes* snake venom in the Kingdom of Saudi Arabia[J]. *Saudi medical journal*, 2012, 33(8):846-851.
- [42] Aguilar I, Sanchez E E, Giron M E, et al. Coral snake

antivenom produced in chickens(*Gallus domesticus*) [J].
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,
2014,56(1):61-66.

- [43] 刘四红,侯力强,孔天翰. 抗中华眼镜蛇毒鸡卵黄抗体的制备及其效价测定[J]. 蛇志,2006,18(1):1-5.
Liu S H, Hou L Q, Kong T H. Preparation and titration for venom of *Naja atra* antibodies from chicken egg yolk [J]. Journal of Snake,2006,18(1):1-5.
- [44] 刘四红,孔天翰. 抗眼镜蛇毒鸡卵黄抗体的制备,纯化和保护性实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2007,22(12):2453-2457.
Liu S H, Kong T H. The preparation, purification and biological activity of anti-cobra immunoglobulin yolk [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 22(12): 2453-2457.
- [45] 王桂平,廖洪映,刘新艳,等. 抗蝮蛇毒卵黄抗体的制备及其免疫特性研究[J]. 中国热带医学,2008,8(8):1285-1287.

Wang G T, Liu H Y, Liu X Y, et al. Preparation and immunological characteristic of an antibodies to viper venom egg yolk[J]. China Tropical Medicine, 2008, 8(8): 1285-1287.

- [46] Kiem T. The production of *Calloselasma rhodostoma* antivenom (CRAV) from egg yolk of hens immunized with venom; its application for treatment of snake bite patients in Vietnam [C]//Proceedings of the XIIIth world congress of the international society of toxinology, Paris, [S. l.]:[s. n.],2000.
- [47] Sevcik C, Díaz P, D'suze G. On the presence of antibodies against bovine, equine and poultry immunoglobulins in human IgG preparations, and its implications on antivenom production[J]. Toxicon, 2008, 51(1): 10-16.
- [48] Díaz P, Malavé C, Zerpá N, et al. IgY pharmacokinetics in rabbits; Implications for IgY use as antivenoms [J]. Toxicon, 2014, 90: 124-133.

Animal Sciences

Immunoglobulin of Egg Yolk (IgY) and Its Research Progress on Treatment of Snakebite

WANG Wenwen, HE Qiyi, LIU Gang, YU Xiaodong

(Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology (Ministry of Education),

Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance,

Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Science,

Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: Due to some serious disadvantages such as high cost, low yield and some side effects of antivenom, looking for more ideal antidotes to treat snakebite victims has been becoming important. Naturally, immunoglobulin of egg yolk(IgY) has been given much attentions and become an important object for our developing new antidotes against the snakebites because of IgY's special features in production and effect of neutralization. Current studies show that IgY and mammalian IgG share a similar biological function but they have some striking differences in the structures. IgY is particularly stable at high pressure and across a diverse range of pHs but it is susceptible to high temperature and proteolytic. Compared with IgG, IgY can be produced relatively cheaply and noninvasively and the utility of IgY in immunological assay can reduce the cause of false positive results. The resulting immune response of immunized of hens can be influenced by four main factors: the antigen (dose, molecular weight), the type of adjuvant, the route for antigen injection and interval between immunisations. The purification method can influence the purity and activity of IgY. The development of anti-snake venom IgY and its good neutralizing effects on various toxicological effects caused by snake venoms have been showed in much studies. With the advance in biotechnology, anti-snake venom IgY is expected to be developed into antidote, rapid diagnosis test paper, affinity ligand, oral preparation and so on, the application prospect of anti-snake venom IgY in the research field of snakebite is wide.

Key words: antidotes; Immunoglobulin of egg yolk (IgY); anti-snake venom IgY