약학회지 제 47 권 제 6 호 438~443 (2003)
Yakhak Hoeji Vol. 47, No. 6

藥學會誌

페튜인에 대한 면역글로부린 Y의 생성 및 친화성 컬럼에 의한 분리

정병욱 · 정영윤 · 김윤중 · 박지훈 · 구완모 · 김병수 · 김기돈 · 김하나 · 김하형#
중앙대학교 약학대학

(Received November 14, 2003; Revised December 14, 2003)

Production of Anti-fetuin Immunoglobulin Y and its Isolation Using an Affinity Column

Byung Wook Jung, Young Yun Chung, Youn Jung Kim, Jee Hun Park, Wan Mo Koo, Byung Su Kim, Ki Don Kim, Ha Na Kim and HaHyung Kim#
College of Pharmacy, Chung-Ang University Seoul 156-756, Korea

Abstract — For the investigations of the usefulness of immunoglobulin Y (IgY), we attempted to produce and isolate IgY from egg yolk of white Leghorn hens immunized with fetuin as a model antigen. We used three methods to optimize the recovery of IgY: water dilution, polyethylene glycol, and carrageenan. The daily yield of anti-fetuin IgY from egg yolk was also examined, and it was isolated using a fetuin-affinity column at a yield of IgY of 2.7% from total IgY. Furthermore, peroxidase-labeled antifetuin IgY was prepared, and was used to determine the minimum sensitivity against fetuin, which was found to occur to a fetuin concentration of 1 ng/m*l*.

Keywords □ IgY, production, isolation, sensitivity

최근 표적단백질을 이용하여 질병의 진단과 치료에 이용하고자 많은 시도가 이루어지고 있으며, 그 중 이종물질인 항원을 특이적으로 인식하여 결합하는 면역글로부린은 특정당을 인식하는 탄수화물결합 단백질(렉틴)과 함께 크게 주목 받고 있다. 현재 보고되고 있는 면역글로부린은 주로 생쥐, 토끼, 양 등에서 얻어진 항체를 주로 사용하고 있으나, 항체의 대량 획득이 가능한 조류의 난황(egg yolk)으로부터 얻을 수 있는 면역글로부린 Y(IgY)가 최근 이용되기 시작하였다.[1,2]

IgY는 IgG, IgE 등의 진화적 조상으로 알려져 있으며, 주로 조류나 양서류 등의 혈청 및 난황에 존재하고, 포유류의 IgG와 같이 2개의 heavy chain과 2개의 light chain의 구조로 되어 있으나,[3] 분자량이 더 크며(180 kDa), 보체, protein A 혹은 protein G와의 결합력이 없는 것으로 알려져 있다.[4,5] 또한, 조류의 난황에는 약 100~150 mg 정도의 IgY를 함유하고 있고, 1년에 생산되는 약 280개의 난으로부터 얻어지는 난황에는 총 28~42 g의 IgY를 얻을 수 있게 된다.[6] 특히 조류를 통하여 얻어지는 항체의 특성상 포유류 유래의 단백질 항원에 대해 마우스 유래 항체에 비해 보다 큰 친화력과 선택성을 갖는 것으로 알려져 있다.[7,8]

IgY와 관련된 최근의 연구내용은 난황으로부터 지질 등을 제거한 순도 높은 IgY의 분리 방법,[9-11] 암 연구에의 적용,[12,13] 프라그 형성억제에 관한 연구,[14] 진단분야에서의 효율적 이용 가능성,[15] 경구투여용 약물로의 개발[16] 등이 주를 이루고 있다.

본 연구에서는, IgY의 진단분야에서의 효과적 활용방안을 모색하고자 페튜인(fetuin)을 모델 단백질항원으로 하고, white Leghorn 종의 hen에 면역시켜 얻어지는 난황으로 부터 water dilution법,[17] polyethylene glycol법,[18] carrageenan법[19]에 의해 IgY를 분리, 정제하고 총 IgY 중 페튜인에만 선택적으로 결합하는 IgY(anti-fetuin IgY)의 생성을 확인하였다. 또한 페튜인 친화성 컬럼(fetuin-affinity column)으로부터 총 IgY 중 anti-fetuin IgY만을 선택적으로 분리, 정제하여, 항원에 대한 측정 감도를 농도에 대해 확인하였다.

실험방법

실험재료

White Leghorn hen은 독일 Lohmann사에서 입수하였다. 페튜인, bovine serum albumin(BSA), peroxidase-labeled anti-chicken IgG(토끼유래), Freund's complete adjuvant, Freund's

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5612 (팩스) 02-823-5612
(E-mail) hahyung@cau.ac.kr

incomplete adjuvant, peroxidase type VI-A는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 그 외 분석용 시약은 모두 특급을 사용하였다.

항원의 정량 및 순도확인

항원으로 사용한 페튜인의 정량은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford법[20]에 의해 실시하였으며, 순도 확인을 위하여 전기영동과 이온교환크로마토그래피를 실시하였다. 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)은 Laemmli에 의한 방법[21]에 따라 10%의 polyacrylamide 겔을 이용하여 실시하였고, 이온교환 크로마토그래피에 의한 분석시에는 Resource Q 음이온 교환컬럼(Pharmacia)을 이용하여, 이동상은 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), gradient는 35분 동안 NaCl 농도를 0에서 1 M이 되도록 하였으며, 유속 1.0 ml/min, 검출기 파장은 280 nm로 하였다.

실험동물 및 면역방법

White Leghorn hen을 2주 이상 사료를 중단한 상태에서 사료를 첫날에는 5 g, 2일째에는 10 g, 그 이후에는 10 g씩 증가시킨 뒤 투여 총량이 90 g이 된 뒤로는 자유롭게 투여하였다. 사육환경은 실내, 실온 상태에서 오전 9시부터 오후 6시경까지 백열등을 점등시켜 주고 2마리를 각기 다른 케이지에서 사육하였으며 비교적 건강상태가 양호하고 규칙적인 산란을 하는 hen을 실험에 이용하였다. 면역방법은 페튜인 100 μg을 10 mM phosphate buffer(pH 7.4), 0.15 M NaCl(PBS) 70 μl에 용해하고 그 9배 용량에 해당하는 Freund's complete adjuvant와 혼합 후 emulsion 상태를 확인하고, 그 중 560 μl(80 μg)를 hen의 가슴부위 4~5군데에 피하주사하였다. 1차 면역 후 12일째에 Freund's complete adjuvant 대신에 Freund's incomplete adjuvant를 이용하여 동일한 방법으로 2차면역을 실시하였다.

난황 및 IgY의 분리

1차 면역후 30일 동안 얻은 달걀로부터 난황을 얻기 위하여 난 껍질을 조심스럽게 깨고 증류수로 지질 등을 제거 후 종이타월 위에 굴려 흰자위를 최대한 제거하였다. 그리고 난황의 막에 23 게이지 주사기로 구멍을 뚫어 난황만을 취하여 실험에 이용하였다. 하나의 난으로 부터 약 10~12 ml의 난황을 얻을 수 있었다. IgY의 분리에는 water dilution법을 적용하였으며, 그 방법은 문헌에 보고된 방법[17]을 일부 변형하여 실시하였다. 난황 10 ml를 증류수 90 ml로 희석 후 100 mM HCl로 pH 5.0이 되도록 하고 4°C에서 6시간 방치하였다. 이 용액을 신속히 여과지(*Whatman no.1*)로 여과하고 4°C에서 10,000 g로 25분간 원심분리하였다. 침전물을 취해 20 ml의 PBS에 분산시키고 4°C에서 2,000 g로 25분간 원심분리한 후 다시 침전물을 100 ml의 PBS에 분산시키고 0.45 μm의 PVDF syringe filter로 여과하여 water soluble fraction(WSF)을 얻었다. WSF에 sodium sulphate를 서서히 가하여 18%가 되도록 하고 30분간 실온에서 방치한 뒤 4°C에서 2,000 g로 20분간 원심분리후 침전물을 10 ml의 PBS에 분산시켰다. 이 용액을 4°C에서 2,000 g로 20분간 원심분리하여 상층액에 36% sodium sulphate을 가하고 최종적으로 16%가 되도록 하고 30분간 방치하였다. 이 용액을 4°C에서 2,000 g로 20분간 원심분리한 뒤 침전물을 5 ml의 PBS에 분산시키고 다시 PBS 용액에 대해 3회 투석하였다. 상기 언급한 water dilution법 이외에 polyethylene glycol법과 carrageenan법은 각각 문헌[18,19]에 따라 실시하였다.

Anti-fetuin IgY 생성 및 분리

면역 후 30일 동안 water dilution법에 의해 얻어진 WSF를 시료로 하여 anti-fetuin IgY의 생성을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의해 확인하였다. 페튜인(1 mg/ml)을 microplate well에 코팅하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 10배 희석한 WSF 50 μl를 well에 코팅하고 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 aspiration으로 제거 후, 0.1% Tween을 포함하는 PBS(PBST)로 3회 세척하였다. 그리고 PBS에 용해시킨 1% BSA 100 μl를 가하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 aspiration으로 제거하고, PBST로 3회 세척하였다. 여기에 peroxidase-labeled anti-chicken IgG를 PBS로 30,000배 희석한 용액을 가한 뒤 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 aspiration으로 제거하고, PBST로 3회 세척하였다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) 55 mg을 PBS 100 ml에 녹인 용액에 H_2O_2 1 μl를 넣고 각 well에 100 μl씩 넣은 뒤 microplate reader를 이용하여 415 nm에서 흡광도 값을 측정하고 10분 후 다시 측정하여 얻어지는 상대값을 구하여 측정오차를 줄였다. Anti-fetuin IgY의 분리시에는 28일째에 얻어진 난황으로부터 WSF를 얻고, 이를 PBS로 투석 후 시료로 사용하였다. PBS로 페튜인 친화성 컬럼을 세척하여 미리 평형화하고, WSF 2 ml를 컬럼에 흘리고 동일 완충액으로 유출시켜 1 ml씩 분취하면서 280 nm에서 흡광도를 확인하였다. 컬럼에 흡착된 IgY는 50 mM glycine-HCl buffer(pH 2.0)로 용출시켜 얻었으며, 분취액은 즉시 1 M Tris-HCl(pH 8.5)을 가하여 중성화하였다.

Anti-fetuin IgY의 검출감도

Anti-fetuin IgY를 Harlow 등의 방법[22]에 따라 horseradish peroxidase에 결합시키고 페튜인에 대한 anti-fetuin IgY의 검출감도를 상기 anti-fetuin IgY의 생성확인 방법 중 WSF 용액을 가하는 단계를 생략하고 peroxidase-labeled anti-chicken IgG 대신 peroxidase-labeled anti-fetuin IgY를 사용하여 동일한 방법으로 실시하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 모델항원으로 사용한 페튜인은 포유동물 태아혈청에서 특이적으로 발현되는 분자량 48.4 kDa, 당함량 약 22%의 당단백질로서,[22] 항원으로 사용하기 위하여 제조사로부터 구입한 페튜인의 순도를 확인하였다. 전기영동 결과, 약 48.4 kDa에서 단백질 밴드가 확인되었으며, 이는 페튜인에 결합된 당과 시알산 잔기수에 기인한 페튜인의 전형적인 패턴임을 확인하였고,[23] pI가 3.2~3.8인[23] 페튜인은 음이온 교환 컬럼에 의해 단일피크를 나타내었다(data not shown). 상기 결과를 통해 항원의 순도를 확인하고 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

페튜인으로 면역후 얻어진 난황으로 부터 IgY를 분리 하는 방법은 문헌에 의해 여러 방법들이 보고되고 있으나, 본 연구에서는 water dilution법, polyethylene glycol법, carrageenan법에 따라 시도하고 그 효율을 비교하였다. Water dilution법을 적용하여 페튜인으로 면역한 white Leghorn hen으로부터 얻어진 용액을 각 단계별로 Laemmli법에 따라 10%의 polyacrylamide 겔을 이용하여 전기영동을 실시한 결과, 약 180 kDa에서 IgY의 밴드를 lane 3에서 확인하였다(Fig. 1). 난황중에는 IgY 이외에 수용성 단백질로 α-livetin(chicken serum albumin), β-livetin(α2-glycoprotein) 및 여러 지단백들이 함께 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다. 정제의 각 단계별로 IgY 이외의 단백질들이 제거되고 최종적으로 순도 95% 이상의 IgY로 정제되어지는 것을 확인하였다. 또한, 2-mercaptoethanol을 첨가한 경우에는 IgY의 heavy chain과 light chain을 나타내는 2개의 밴드를 확인하였다. IgY는 280 nm에서의 흡광도값이 1.33인 경우 1 mg/ml임이 보고되어 있는 점과 Bradford법에 의한 단백질 정량에 의해 난황 10 ml로부터 94.0 mg의 IgY를 얻을 수 있었다.

한편, polyethylene glycol법과 carrageenan법에 의한 IgY 분리를 시도한 결과, IgY의 순도를 90% 이상으로 하기 어려웠으며 각각 52.6 mg, 73.4 mg을 얻었다(data not shown). 상기 결과로부터 water dilution법에 의한 IgY의 분리가 가장 고순도로 회수율이 높은 것을 확인하고 이하 모든 실험에 water dilution법을 적용한 시료를 사용하였다.

항원 페튜인으로 면역 후 30일 동안 얻어지는 난황에서의 anti-fetuin IgY의 생성률을 확인하였다. 페튜인으로 코팅한 96 well 플레이트에 water dilution법으로 분리한 WSF를 결합시키고 peroxidase-labeled anti-chicken IgG로 반응시켜 그 생성을 확인한 결과, 면역 후 8일까지는 큰 변화가 없었으나 10일째부터 24일 째까지 단계적으로 흡광도 값이 증가하였고, 24일 이후에는 큰 변화가 없었다(Fig. 2). 이 결과로부터 페튜인에 대한 IgY 항체가 면역시킨 hen을 통해 난황에 성공적으로 생성되었으며, 그 생성시기는 면역 후 10일째부터 24일째까지는 증가하다가 그 이후로는 비슷한 양인 것으로 나타났다.

페튜인으로 면역시킨지 28일째 되는 난황에서 얻은 WSF를 미리 제작한 페튜인 친화성 컬럼에 결합시키고 컬럼에 미결합한 물질의 흡광도값이 완전히 0이 된 것을 확인하고 컬럼에 흡착된 IgY는 50 mM glycine buffer(pH 2.0)로 용출시켜 크로마토그램을 작성하였다(Fig. 3). 컬럼에 시료를 반응시키고 2~11번까지 얻어진 분취액들은 페튜인 컬럼에 결합하지 않은 단백질들이며, 15번부터는 pH 2.0의 완충액을 흘려 친화성 컬럼으로부터의 분

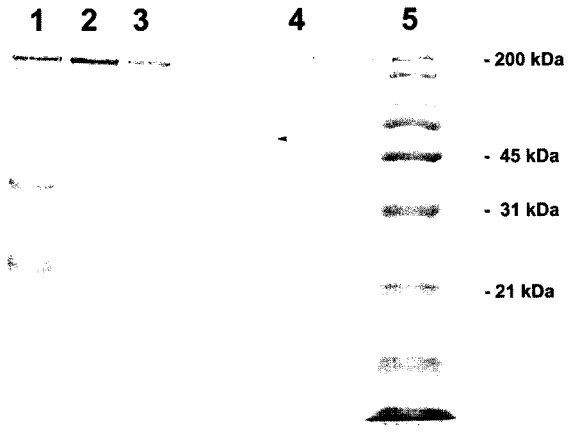

Fig. 1 – SDS-PAGE of purification step of IgY obtained from egg yolk with water dilution method. Lane 1, WSF; lane 2, treatment with 18% sodium sulphate; lane 3, IgY; lane 4, IgY with 2-mercaptoethanol; lane 5, molecular weight marker (myosin, 200 kDa; β-galactosidase, 116 kDa; phosphorylase b, 97.4 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 31 kDa; soybean trypsin inhibitor, 21 kDa; lysozyme, 14 kDa).

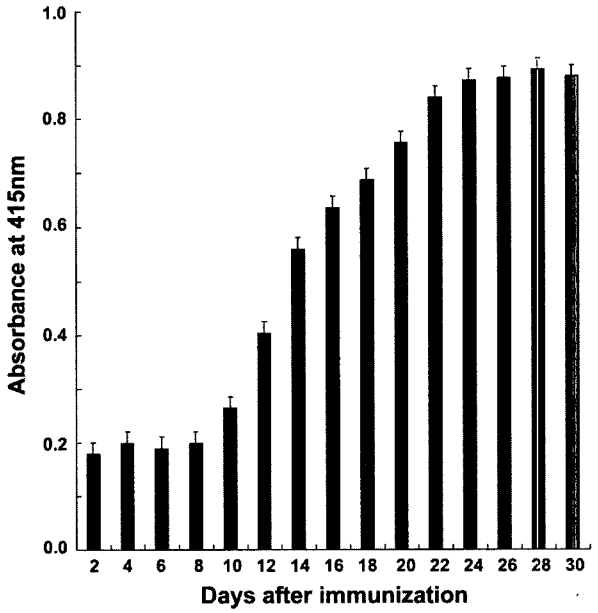

Fig. 2 – ELISA absorbances on the binding of anti-fetuin IgY obtained from WSF after immunization.

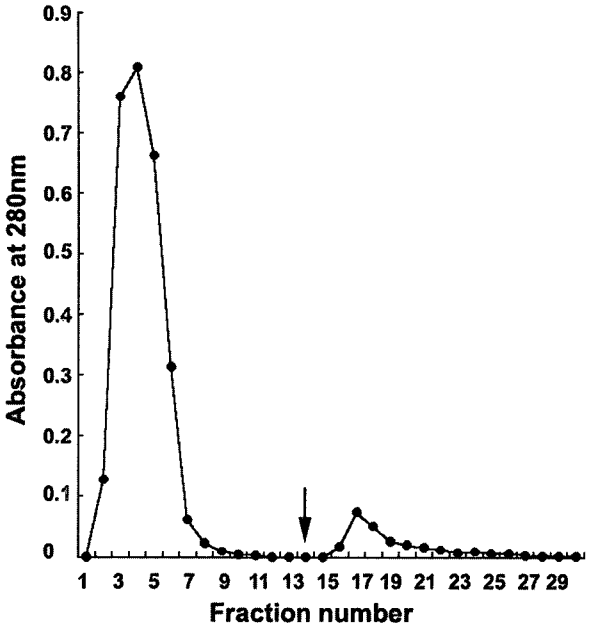

Fig. 3 – Elution profile of anti-fetuin IgY using fetuin-affinity column. Arrow indicates the point elution with 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0).

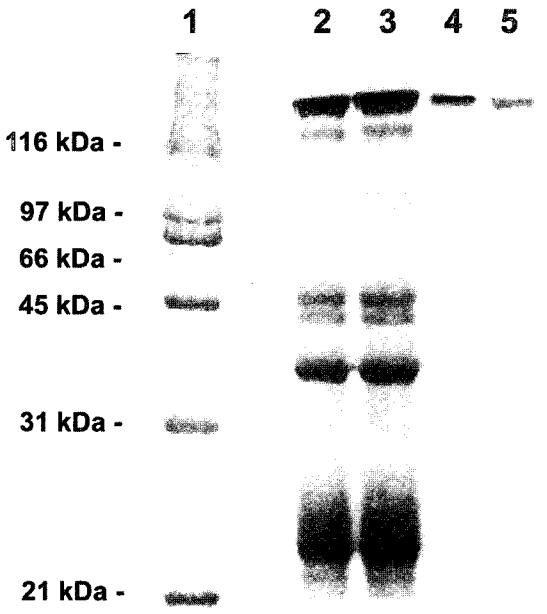

Fig. 4 – SDS-PAGE of purified anti-fetuin IgY obtained from fetuin-affinity column. Lane 1, molecular weight marker; lane 2, fraction 4; lane 3, fraction 5; lane 4, fraction 17, lane 5, fraction 18.

리를 시도하고 흡광도값을 갖는 17~21번 분취액을 얻었다.

17~21번 분취액을 모아 2, 4, 8, 16배로 각각 희석하고 페튜인으로 코팅한 96 well 플레이트에서 anti-fetuin IgY 생성확인 실험과 동일한 방법으로 실험한 결과, 흡광도값이 희석비가 커질수록 저하하는 것으로 나타나 이들 단백질이 페튜인에 특이적으로 결합한 anti-fetuin IgY임을 알 수 있게 되었으며(data not shown), 전기영동에 의해 얻은 분취액 4, 5번은 페튜인 친화성 컬럼에 미결합한 물질이며, 분취액 17, 18에서는 anti-fetuin IgY 이외의 물질이 제거된 단일밴드의 IgY임을 확인하였다(Fig. 4).

하나의 난황으로부터 얻어진 시료에서 분리한 anti-fetuin IgY는 총 2.5 mg이었으며, 이는 총 IgY 94.0 mg 중 2.7%에 해당하는 양으로, 이미 문헌에[24] 보고된 바와 같이 특정항원의 양이 총 IgY중 항원에 따라 2~10%의 범위 안에 들어오는 결과를 얻었다.

페튜인 친화성 컬럼에 의해 얻어진 anti-fetuin IgY의 응용의 일례로 anti-fetuin IgY를 peroxidase효소와 결합시켜 제작한 peroxidase labeled anti-fetuin IgY를 이용하여 ELISA에 의해 항원에 대한 검출한도를 확인하였다. 먼저 10^{-1}~10^{-12} mg/ml 농도의 페튜인으로 96 well 플레이트를 코팅하고 peroxidase labeled anti-fetuin IgY를 100배로 희석하여 반응시킨 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 10^{-1} mg/ml에서 가장 높은 반응성을 나타냈으며 농도가 감소할수록 흡광도 값이 감소하였으나 10^{-6} mg/ml(1 ng/ml) 농도까지는 검출되었고, 10^{-7}부터 10^{-12} mg/ml 농도에서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 이 결과는 peroxidase labeled anti-fetuin IgY에 의해 페튜인이 1 ng/ml 농도와 같은 극미량에도 검출이 가능함을 나타내는 결과이며, peroxidase labeled anti-fetuin IgY의 희석비를 100 이하로 낮출 경우 보다 미량의 페튜인을 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

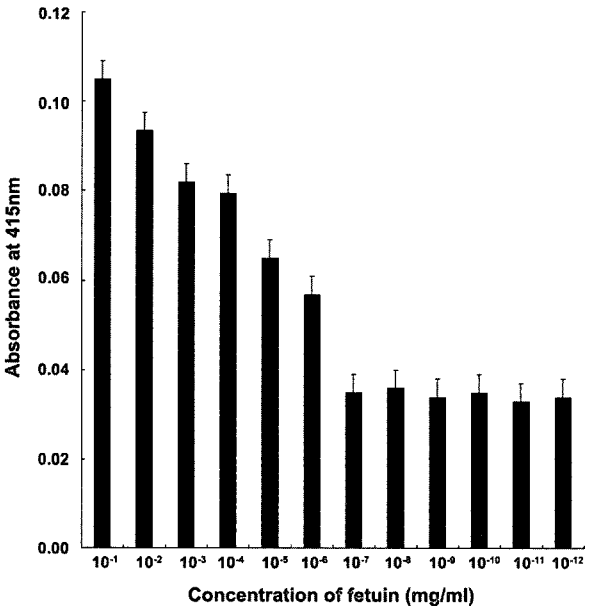

Fig. 5 – ELISA absorbances on the detection of peroxidase labeled anti-fetuin IgY to various concentrations of fetuin.

결 론

본 연구에 의해 난황으로부터 IgY를 분리하는 방법 중 water dilution법이 수득률 및 분리정제의 효율성에서 가장 우수한 것으로 나타났으며, 항체로서의 활성을 잃지 않는 anti-fetuin IgY를 분리, 정제하였다. 항원으로 면역시킨 후 10일째부터 anti-fetuin IgY가 생성되기 시작하여 24일째에 최대량이 되는 것을 확인하였으며, 총 IgY 중 anti-fetuin IgY의 생성비율은 약 2.7% 이었다. 또한, peroxidase-labeled anti-fetuin IgY를 제작하여 항원 페튜인에 대한 감도를 확인한 결과, 1 ng/ml 농도까지 검출이 가능한 것으로 나타났다.

IgY는 본 연구에서 제시한 바와 같이 항체 생성이 비교적 용이하며, 포유동물 유래 항원에 대해 특이성이 높고 대량으로 얻을 수 있어 다양한 분야에서 이용 가능하며, 현재는 질병시 체내에서 미량 변화를 일으키는 단백질에 특이적으로 결합하는 IgY를 제작하여 생쥐 유래의 IgG와의 검출한계를 비교, 분석하는 실험을 실시하고 있으며, 이 IgY는 질병의 조기 진단에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 2002학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1) Zhang, W. W. : The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. *Drug Discovery Today* **8**, 364 (2003).
2) Parham P. : Antibody structure. The duck's dilemma. *Nature* **374**, 16 (1995).
3) Warr, G. W., Magor, K. E. and Higgins, D. A. : IgY, clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* **16**, 392 (1995).
4) Jensenius, J. C., Andersen, I., Hau, J., Crone, M. and Koch, C. : Eggs; conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J. Immunol. Methods* **46**, 63 (1981).
5) Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. : Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **57**, 450 (1993).
6) Mine, Y. and Kovacs-Nolan, J. : Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease. *J. Med. Food* 5, **159** (2002).
7) Patterson, R., Youngner, J. S., Weigle, W. O. and Dixon, F. J. : Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. *J. Immunol.* **89**, 272 (1962).
8) Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T. and Hubscher, U. : Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528 (1990).
9) Polson, A. : Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest*. **14**, 323 (1985).
10) Kim, H. and Nakai, S. : Simple separation of immunoglobulin from egg yolk by ultrafiltration. *J. Food Sci.* **63**, 485 (1998).
11) Polson, A., von Wechmar, M. B. and van Regenmortel, M. H. : Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun*. **9**, 475 (1980).
12) Lemany, G., Roger, P., Mani, J. C., Robert, M., Rocheport, H. and Brouillet, J. P. : High-affiniy antibodies from hen's-egg yolk against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R); Characterization and poten- tial use in clinical cancer studies. *Int. J. Cancer* **80**, 896 (1999).
13) Yang, J., Jin, Z., Yu, Q., Yang, T., Wang, H. and Liu, L. : The selective recognition of antibody IgY for digestive system cancers. *Chin. J. Biotechnol*. **13**, 85 (1997).
14) Hatta, H., Tsuda, K., Ozeki, M., Kim, M., Yamamoto, T., Otake, S., Hirasawa, M., Katz, J., Childers, N. K. and Michalek, S. M. : Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to Streptococcus mutans. *Caries Res*. **31**, 268 (1997).
15) Gross, M. and Speck, J. : Avian yolk antibodies in diagnosis and research. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr*. **103**, 417 (1996).
16) Shimizu, M. : Encapsulation of chicken egg yolk immunoglobulin G (IgY) by liposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **57**, 1445 (1993).
17) Akita, E. M. and Nakai, S. : Immunoglobulins from egg yolk; Isolation and Purification. *J. Food Sci.* **57**, 629 (1992).
18) Polson, A. : Isolation of IgY from the yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest*. **19**, 253 (1990).
19) Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agric. Biol. Chem*. **54**, 2531 (1990).
20) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
21) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).

22) Harlow, E. D. and Lane, D. : *Antibodies*. Cold Spring Harbor Lab., New York p. 346 (1988).
23) Baenziger, J. U. and Fiete, D. : Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J. Biol. Chem*. **254**, 789 (1979).
24) Schade, R., Burger, W., Schoneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A. and Kobilke, H. : Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex Alternativen Zu Tierexp*. **11**, 75 (1994).