

طراحی روشی ساده با راندمان بالا برای تخلیص پروتئین‌های عمده سفیده تخم مرغ با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون

شمسی ویسی*، دکتر علی مصطفائی**، دکتر زهیر محمد حسن***

دریافت: ۸۶/۵/۲۴، پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۴

چکیده:

مقدمه و هدف: سفیده‌ی تخم مرغ حاوی چهار پروتئین پرمقدار است که استفاده‌های متعددی دارند. در مطالعه‌ی حاضر روشی ساده و مناسب برای تخلیص این پروتئین‌ها بر پایه‌ی کروماتوگرافی تعویض یون طراحی و اجرا گردید. **روش کار:** در این مطالعه تجربی سفیده با تغییر pH از مواد نامحلول جدا گردید. عصاره‌ی حاصل طی دو مرحله کروماتوگرافی تعویض یون به ترتیب در ستون‌های کربوکسی متیل سفارژ و دی اتیل آمینو اتیل سفارژ تفکیک گردید. خلوص و بازدهی هر پروتئین با کمک الکتروفورز و تعیین درصد آن نسبت به پروتئین تام نیز تعیین گردید. **نتایج:** این پژوهش نشان داد که خلوص اوآلبومین، اوترانسفرین، اوموگوئید و لیزوزیم به ترتیب ۹۷، ۹۷، ۸۵ و بیش از ۹۹ درصد و بازدهی آنها به ترتیب ۹۸، ۹۸، ۹۵ و ۹۹ درصد می‌باشد. **نتیجه نهایی:** بازدهی و خلوص بالا، تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم یا زیاد از نکات مثبت این روش محسوب می‌شود.

کلید واژه‌ها: تخلیص / سفیده تخم مرغ / کروماتوگرافی تعویض یون

مقدمه:

متعدد دارد (۵-۲). اوترانسفرین مهم‌ترین پروتئین انتقال دهنده آهن است و حدود ۱۳ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد. وزن این پروتئین ۷۷/۷ کیلودالتون و pI آن ۶/۱ است (۵-۲). اوترانسفرین به عنوان یک افزودنی غذایی در محصولات غنی شده‌ی آهن قابل استفاده است. بعلاوه نشان داده‌اند که این پروتئین حتی بدون حضور آهن در ساختمان خود نیز خاصیت باکتری‌کشی دارد (۶). اوموگوئید که ۱۱ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد، با اسپکتروسکوپی جرمی وزنی معادل ۲۸ کیلودالتون دارد و pI آن ۴/۱ است. در روش SDS-PAGE وزن این پروتئین در محدوده ۴۳-۳۰ کیلودالتون دیده می‌شود. وزن بالا و متنوع اوموگوئید در روش SDS-PAGE

حدود ده درصد وزن سفیده‌ی تخم مرغ را پروتئین تشکیل می‌دهد. اوآلبومین، اوترانسفرین، اوموگوئید و لیزوزیم چهار پروتئین پرمقدار سفیده هستند که بالغ بر ۹۰ درصد محتوای پروتئینی آن را به خود اختصاص می‌دهند (۱).

اوآلبومین بیش از نیمی (۵۴٪) از محتوای پروتئینی سفیده را تشکیل می‌دهد و مسئول بخش عمده‌ی ویژگی‌های عمومی سفیده است. وزن این پروتئین تک‌واحدی ۴۴/۵ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک (pI) آن ۴/۵ است. اوآلبومین یک پروتئین مرجع محسوب می‌شود، همچنین در زمینه‌ی بیوشیمی به عنوان پروتئین حامل، نگهدارنده، عامل مسدودکننده یا استاندارد، موارد استفاده

* کارشناس ارشد گروه بیوشیمی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران

** دانشیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (amostafaie@kums.ac.ir)

*** استاد گروه ایمونولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

شد. رسوب حاصل دور ریخته شد و مایع رویی جهت مراحل بعد نگهداری شد.

کروماتوگرافی تعویض کاتیون: کروماتوگرافی تعویض کاتیون در ستونی به ارتفاع ۱۴ و قطر داخلی دو سانتیمتر که با رزین کربوکسی متیل سفارز سی ال ۶-بی (فارماسیا) پر شده بود، انجام گرفت. ستون با حداقل ۱۰ حجم بافر تریس - HCl ۵۰ میلی مولار با pH=۸ شسته شد تا به تعادل بافری رسید. سپس عصاره‌ی سفیده که یک شب در مقابل بافر تریس دیالیز شده و غلظت پروتئین آن در دامنه ۲۵-۲۰ میلی گرم در میلی لیتر تنظیم شده بود، به کمک پمپ پرستالتیک (فارماسیا) با سرعت ۵۰ میلی لیتر در ساعت روی ستون برده شد. پس از ورود نمونه، جریان بافر با همان سرعت برقرار گردید و فراکسیون‌ها در حجم ۵ میلی لیتر با کمک دستگاه جمع کننده (فارماسیا) جمع آوری گردید. پس از اینکه جذب مایع خروجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر به نزدیک صفر رسید، برای جداکردن پروتئین‌های چسبیده به ستون از شیب ۰/۵ - ۰ مولار کلرید سدیم در بافر استفاده شد.

کروماتوگرافی تعویض آنیون: کروماتوگرافی تعویض آنیون در ستون حاوی رزین دی اتیل آمینو اتیل سفارز (فارماسیا) که طول آن ۱۳ و قطر داخلی آن دو سانتیمتر بود، انجام گرفت. ابتدا این ستون با حداقل ده حجم از بافر تریس - HCl ۵۰ میلی مولار با pH=۸، حاوی کلرید سدیم ۳۰ میلی مولار شسته شد تا به تعادل بافری رسید. سپس نمونه‌ی پروتئین که در بافر تریس - HCl به تعادل رسیده بود، وارد ستون گردید. سرعت جریان بافر در طول آزمایش ۵۰ میلی لیتر در ساعت بود. پس از ورود نمونه، جریان بافر در ستون برقرار گردید تا خروجی ستون به صفر رسید (در طول موج ۲۸۰ نانومتر). برای جداسازی پروتئین‌های چسبیده به ستون، ابتدا از شیب خطی ۱۵۰-۳۰ میلی مولار کلرید سدیم در بافر و سپس شیب غیر خطی (پله ای) ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم در بافر استفاده شد. حجم فراکسیون‌ها در این آزمون ۵ میلی لیتر بود.

الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE): آزمون SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۳ درصد و ژل متراکم کننده ۴ درصد به روش لاملی (۱۵) در ولتاژ ۱۵۰ ولت انجام گرفت. برای انجام این کار، چهار حجم نمونه با یک حجم بافر نمونه مخلوط

ناشی از اتصال کم SDS به این پروتئین به دلیل محتوای بالای کربوهیدرات آن است. بارزترین خصوصیت این پروتئین، قابلیت مهار تریسین است. طبق گزارش، اموکوئید مهم ترین آلرژن سفیده محسوب می شود (۵-۲). لیزوزیم با وزن مولکولی ۱۴/۱ کیلودالتون و pI معادل ۱۰/۷ حدود ۳/۵ درصد پروتئین‌های سفیده را تشکیل می‌دهد (۵-۲). این پروتئین که یک عامل ضدباکتریایی است، می‌تواند استفاده‌های متنوعی در علوم زیستی، یا در غذا به عنوان افزودنی بی‌ضرر داشته باشد (۷).

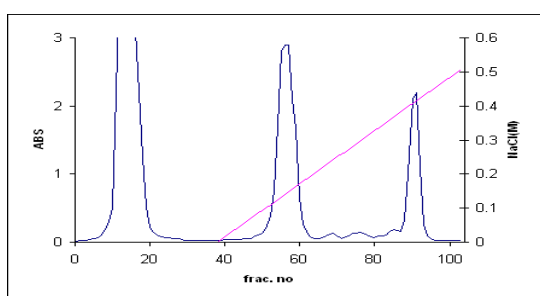
با توجه به کاربردهای فراوان پروتئین های پرمقدار سفیده تخم مرغ، روش های متنوعی مبتنی بر رسوب دهی با استفاده از نمک ها و حلال های آلی و انواع کروماتوگرافی، بخصوص کروماتوگرافی تعویض یون برای جداسازی این پروتئین ها بکار رفته است (۱۳-۸، ۵، ۲). روش های رسوب دهی به رغم سادگی و سرعت، به تنهایی روش های مطلوبی در بدست آوردن پروتئین های با خلوص و راندمان بالا از سفیده نبوده و معمولاً برای جداسازی یک پروتئین قابل استفاده اند (۸). دراستفاده از روش های کروماتوگرافی نیز معمولاً امکان تخلیص دو یا سه نوع از پروتئین های پرمقدار سفیده با راندمان بالا فراهم شده و در مطالعات معدودی از این روش ها برای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده استفاده شده است (۱۴-۱۲). در چنین مطالعاتی نیز معمولاً درجه‌ی خلوص و راندمان دو پروتئین از پروتئین‌های سفیده مطلوب بوده ولی دسترسی به چهار پروتئین عمده با راندمان و خلوص بالا میسر نشده است. با توجه به اهمیت دست‌یابی به اشکال خالص پروتئین‌های پرمقدار سفیده، در این مطالعه سعی شد، روشی ساده و با بازدهی و خلوص بالا بر پایه کروماتوگرافی تعویض یون برای تخلیص این پروتئین‌ها طراحی و اجرا گردد.

روش کار:

تهیه عصاره‌ی خام سفیده تخم مرغ: در این مطالعه تجربی سفیده‌ی حداقل پنج تخم مرغ مخلوط گردید. یک حجم از سفیده با سه حجم آب نمک (۹ گرم نمک طعام در یک لیتر آب مقطر) حاوی EDTA چهار میلی مولار مخلوط شد. مخلوط به مدت نیم ساعت در دمای اتاق با همزن مغناطیسی بهم خورد. سپس pH آن با اسید کلریدریک نیم نرمال به ۴/۵ رسید و نیم ساعت در این شرایط بهم زده شد. مخلوط ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در ۱۵۰۰۰×g سانتریفیوژ

این پروتئین‌ها که فراوانترین آنها اوآلبومین است، حدود ۹۵ درصد محتوای پروتئینی سفیده را تشکیل می‌دهند. رنگ‌پذیری ضعیف اوموکوئید که به‌صورت یک باند منتشره پایین‌تر از اوآلبومین دیده می‌شود، به‌دلیل محتوای بالای کریوهیدرات این پروتئین است که واکنش اتصالی ضعیفی با رنگ کوماسی R350 دارد. اوترانسفرین و لیزوزیم نیز در این الگو به‌ترتیب در بالا و پایین ژل به‌خوبی مشهود هستند.

نتیجه‌ی آزمون کروماتوگرافی تعویض کاتیون پروتئین‌های سفیده در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲: کروماتوگرافی تعویض یون پروتئین‌های سفیده در ستون کربوکسی متیل سفارز سی‌ال-۶ بی

این کروماتوگرام شامل سه قله‌ی عمده پروتئینی کاملاً جدا و چند قله‌ی کم‌مقدار در حدفاصل قله‌های دوم و سوم است. نتایج الکتروفورز فراکسیون‌های مختلف این کروماتوگرام نشان داد که قله‌ی اول که بیش از نیمی از محتوای پروتئینی این کروماتوگرام را تشکیل می‌دهد، عمدتاً حاوی اوآلبومین و اوموکوئید به ترتیب با اوزان ۴۵ و ۴۰-۳۴ کیلودالتون است (ستون‌های ۱-۳ شکل ۳). در این قله چندین پروتئین کم‌مقدار در موقعیت‌های ۵۸-۵۵، ۸۰-۷۸ و بالاتر از ۱۰۰ کیلودالتون نیز دیده می‌شود. محتوای قله‌ی دوم تقریباً بطور کامل حاوی پروتئین ۷۸ کیلودالتونی اوترانسفرین است که بیش از ۹۷ درصد محتوای پروتئینی این قله را تشکیل می‌دهد (ستون‌های ۴-۹). در الکتروفورز محتوای این بخش، دو ناخالصی به‌صورت دو باند بسیار ضعیف با اوزان تقریبی ۳۵ و ۵۰ کیلودالتون دیده می‌شود. این ناخالصی‌ها کمتر از ۳ درصد محتوای پروتئینی این بخش را تشکیل می‌دهند. قله‌ی سوم کروماتوگرافی تعویض کاتیون حاوی لیزوزیم است. خلوص این بخش که در آزمون الکتروفورز به وضوح مشهود است (ستون‌های ۱۲ و ۱۳ شکل ۳)، نزدیک به ۱۰۰ درصد تخمین زده شد.

گردید و پنج دقیقه در ظرف آب جوش قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها و مارکرهای وزنی (فارماسیا) در چاهک‌های جداگانه اضافه و الکتروفورز گردید. پس از الکتروفورز، ژل با کوماسی آبی R350 (فارماسیا) رنگ‌آمیزی شد و وزن مولکولی پروتئین‌ها براساس مارکرهای وزنی تخمین زده شد.

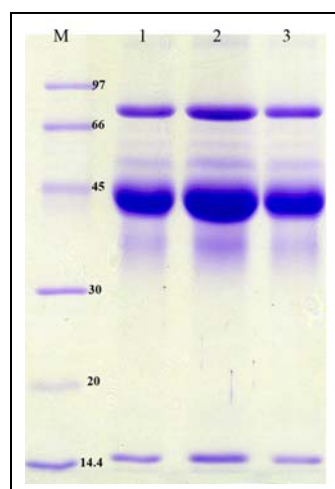
اندازه‌گیری غلظت پروتئین: اندازه‌گیری غلظت پروتئین بر اساس روش UV انجام گرفت (۱۶). برای این کار جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر غلظت پروتئین در آنها محاسبه گردید.

$$\text{غلظت نوری در } ۲۶۰ \text{ نانومتر} - (۱/۴۴) \times$$

غلظت نوری در ۲۸۰ نانومتر) = غلظت پروتئین تعیین درصد خلوص و راندمان (بازدهی): پس از SDS-PAGE هر فراکسیون و رنگ آمیزی ژل، درصد نسبی هر باند پروتئین در ژل رنگ آمیزی شده که بیانگر درصد خلوص بود، با دانسیتومتر (هلنا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر محاسبه گردید. سپس با توجه به پروتئین تام و درصد نسبی هر پروتئین در ژل، مقدار آن پروتئین در هر فراکسیون محاسبه گردید. با مقایسه مقدار هر پروتئین در محصول نهایی و عصاره اولیه، راندمان آن پروتئین تخمین زده شد.

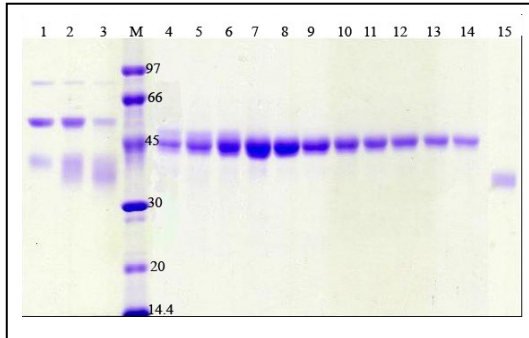
نتایج:

در SDS-PAGE عصاره اولیه سفیده که تحت شرایط pH اسیدی از مواد نامحلول جدا شده‌بود، چهار پروتئین پرمقدار دیده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱: SDS-PAGE پروتئین‌های سفیده تخم مرغ در غلظت‌های مختلف (ستون‌های ۱-۳). ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

دیده می شود، اوموکوئید a است. قله ی انتهایی شکل ۴ که محتوای پروتئین آن کمتر از بقیه بود، حاوی اوموکوئید نوع b است. نتیجه الکتروفورز این بخش حاکی از خلوص بالای این پروتئین و عدم ناخالصی محسوسی در آن است (ستون ۱۵ شکل ۵).



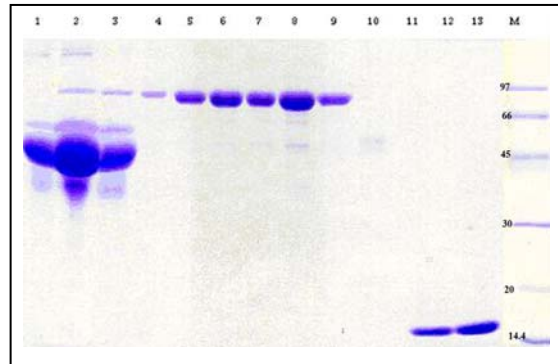
شکل ۵: SDS-PAGE فراکسیون های تفکیک شده سفیده در کروماتوگرافی تعویض آنیون. ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

برآورد راندمان پروتئین های عمده سفیده بعد از تخلیص، با توجه به مقدار هر پروتئین بدست آمده نسبت به مقدار نسبی آن در عصاره اولیه نشان داد که در این مطالعه لیزوزیم، اوترانسفرین، و آللبومین و اوموکوئید به ترتیب با راندمان بالغ بر ۹۹، ۹۸، ۹۸ و ۹۵ درصد (در مجموع هر دو نوع a و b) بدست آمده اند.

بحث:

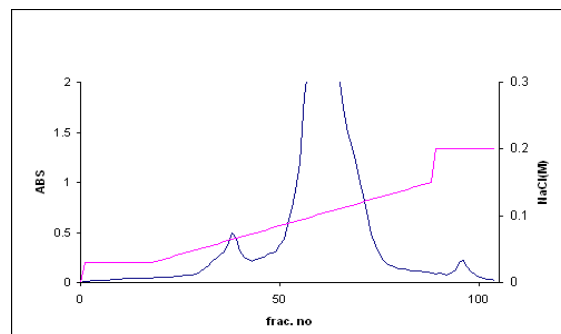
بیش از سه دهه است که کروماتوگرافی تعویض یون به عنوان پرستفاده ترین روش تخلیص پروتئین برای جداسازی پروتئین های سفیده بکار میرود (۱۷، ۱۴-۸، ۵). استفاده از این روش در اغلب مطالعات با هدف تخلیص یک یا دو پروتئین از پروتئین های سفیده بوده و در مطالعات معدودی از این روش برای تخلیص چهار پروتئین عمده سفیده استفاده شده است. در چنین مطالعاتی نیز معمولاً درجه ی خلوص و راندمان دو پروتئین از پروتئین های سفیده مطلوب بوده ولی دسترسی به چهار پروتئین عمده با راندمان و خلوص بالا میسر نشده است (۱۴-۱۲).

در مطالعه حاضر، پس از آزمایشات متعدد برای یافتن شرایط مطلوب از نظر ترتیب نوع ستون تعویض کاتیون و آنیون، نوع و قدرت یونی بافری، شیب کلرید سدیم و شرایط انجام کروماتوگرافی تعویض یون از نظر سرعت



شکل ۳: DS-PAGE فراکسیون های تفکیک شده سفیده در کروماتوگرافی تعویض کاتیون. ستون M مربوط به مارکرهای وزنی با اوزان کیلودالتون.

برای جداسازی محتوای پروتئینی قله ی اول، لوله های مربوط به این قله مخلوط و روی ستون کروماتوگرافی تعویض آنیون برده شد. نتایج این مرحله از کروماتوگرافی در شکل ۴ آمده است. این کروماتوگرام شامل یک قله ی عمده در بخش میانی شیب غلظت نمک طعام و دو قله ی کوچکتر، قبل و بعد از قله ی عمده می باشد.



شکل ۴: کروماتوگرافی تعویض یون محتوای پروتئینی قله اول حاصل از ستون تعویض کاتیون در ستون دی اتیل آمینو اتیل سفارز

الکتروفورز بخش های مختلف این کروماتوگرام نشان داد که قله ی اول اوموکوئید نوع a همراه دو پروتئین دیگر با اوزان ۵۵-۵۸ و ۷۸-۸۰ کیلودالتون است (ستون های ۱-۳ شکل ۵). خلوص اوموکوئید a در این بخش حدود ۷۰ درصد تخمین زده شد. قله ی دوم شکل ۴ که بخش عمده این کروماتوگرام را به خود اختصاص میدهد، آللبومین با درجه ی خلوص بیش از ۹۷ درصد است (ستون های ۱۴-۴ شکل ۵). ناخالصی این بخش که تنها در چند لوله ابتدایی آن به میزان بسیار کم

زیاد قابل انجام می‌باشد. راندمان و درجه خلوص بالای محصولات بدست آمده در این روش که ظاهراً در مطالعات دیگر دیده نمی‌شود، از دیگر مزیت‌های این روش محسوب می‌گردد.

نتیجه نهایی:

بطور خلاصه در این مطالعه چهار پروتئین پرمقدار سفیده تخم مرغ طی دو مرحله متوالی کروماتوگرافی تعویض یون با راندمان و خلوص بسیار بالا بدست آمده است. تکرارپذیری و قابلیت انجام در مقیاس کم یا زیاد از نکات مثبت این روش محسوب می‌شود. محصولات پروتئینی بدست آمده به اهداف مختلف قابل استفاده هستند.

سپاسگزاری:

وظیفه خود می‌دانیم از خانم‌ها مریم چلبی و شهلا کرانی و آقایان امیر کیانی و شهرام پروانه و همچنین سایر همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی که در انجام این مطالعه از مساعدت و همکاری آنها بهره بردیم، مراتب سپاس و تشکر خود را اعلام نماییم.

منابع:

1. Powrie WD, Nakai S. Characteristics of edible fluids of animal origin: eggs. In: Fennema OR (ed). Food chemistry. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1985: 829-55.
2. Awade AC. On egg fractionation: Application of liquid chromatography to the isolation and purification of hen white and egg yolk proteins. Z lebensm Unters Forsch A 1996; 202: 1-14.
3. Ford RPK, Taylor B. Natural history of egg hypersensitivity. Arch Dis Child 1982;57: 649-652.
4. Paulsen K, Hansen TK, Nergard A. Allergen from fish and egg. Allergy 2001; 56 (Suppl 67): 39-42.
5. Li-chan E, Nakai S, Sim J, Bragg DB, Lok V. Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. J Food Sci 1986; 51: 1032-1036.
6. Valenti P, Antonin G, VonHunolstein C, Visca P, Orisa N, Antonin E. Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. Int J Tissue React 1983; 1: 97-105.
7. Jonson EA. Egg-white lysozyme as a preservative for use in food. In: Sim JS, nakai S (eds). Egg Uses and processing Technologies, New Development. International Cab. Walling ford 1994: 77-93.
8. Fraenkel-Conrat H, Feeney RE. The metal-binding activity of conalbumin. Arch Biochem 1950; 29: 101-113.

جریان بافر، حجم نمونه و حجم فراکسیون‌ها توانستیم به روشی دو مرحله‌ای با درجه خلوص و راندمان بالا برای تخلیص چهار پروتئین عمده‌ی سفیده دست یابیم. نتایج این مطالعه نشان داد که راندمان و درجه خلوص لیزوزیم بدست آمده نزدیک ۱۰۰ درصد است و ناخالصی محسوسی در این محصول دیده نمی‌شود. راندمان اوترانسفرین و اوآلبومین نیز بالغ بر ۹۸ و خلوص آنها به ترتیب بیش از ۹۷ و ۹۸ درصد است. اوموکوئید بصورت دو بخش جدا شامل نوع b با خلوص بیش از ۹۸ درصد و نوع a با خلوص نزدیک ۷۰ درصد در مجموع با راندمان نزدیک به ۹۵ درصد بدست آمد. در مقایسه با این مطالعه، واشیر و همکاران نیز با استفاده از رزین کیو - سفارز، لیزوزیم، اوترانسفرین و اوآلبومین را از عصاره‌ی سفیده جدا نمودند (۱۰). نتایج مطالعه آنها نشان داد که لیزوزیم به صورت دو قله پروتئینی با درجات خلوص ۸۸ و ۹۹ درصد و راندمان ۶۲ درصد بدست آمده است. اوترانسفرین نیز در این مطالعه با درجه خلوص ۷۵ درصد و راندمان ۹۹ درصد بدست آمد. اوآلبومین نیز به صورت دو قله با درجه خلوص ۵۴ و ۹۹ درصد و راندمان ۹۳ درصد بدست آمد. روی و همکاران نیز در مطالعه‌ی دیگر برای تخلیص این پروتئین‌ها، با عبور دادن عصاره‌ی سفیده از ستون Sp treamline فقط لیزوزیم را بطور خالص بدست آوردند. آنها سپس با استفاده از تری کلرو استیک اسید، اوآلبومین را رسوب دادند و اوموکوئید نیز توسط اتانول رسوب داده شد. در این روش اوترانسفرین جدا نگردید (۱۱). در مطالعه‌ی ای که در خصوص تخلیص آلرژن‌های سفیده (پروتئین‌های عمده‌ی سفیده) در ایران انجام گرفته، از تعویض کننده‌ی کاتیونی کربوکسی متیل سفادکس و دو بافر فسفات و بافر استات آمونیوم استفاده شده است (۱۷). نتایج این مطالعه که اصول انجام آن بر پایه مطالعات لانگ لند (۱۲) و رودز و همکاران (۱۳) انجام گرفت، حاکی از تخلیص دو پروتئین اوترانسفرین و اوآلبومین به ترتیب در دو بافر فسفات و استات آمونیوم بوده است. در خصوص راندمان و درجه خلوص پروتئین‌های حاصله اطلاعات دقیقی در این مطالعه نیامده است.

بطور کلی نتایج مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعات مشابه در این زمینه نشان می‌دهد که روش طراحی‌شده، روشی ساده و بسیار کارآمد برای تخلیص همزمان چهار پروتئین عمده سفیده تخم مرغ است و در مقیاس کم یا

9. Levison PR, Badger SE, Toom DW, Koscielny ML, Lane L, Butts ET. Economic consideration important in the scale-up of an ovalbumin separation from hen egg-white on the anion exchange cellulose DE92. *J Chromatogr* 1992; 590(1): 49-58.
 10. Vachier MC, Piot M, Awade AC. Isolation of hen egg white lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin using a quaternary ammonium bound to a highly cross-linked agarose matrix. *J Chromatogr (B)* 1995; 664: 201-210.
 11. Roy I, Rao MV, Gupta MN. An integrated process for purification of lysozyme, ovalbumin and ovomucoid from Hen Egg White. *Appl Biochem Biothechnol* 2003;111(1):55-64.
 12. Langeland T, Harbitz O. A clinical and immunological study of allergy to hen's egg white. Purification and identification of a major allergen (antigen 22) in hen's egg white. *Allergy* 1983; 38: 131-139.
 13. Rhodes MB, Azari PR, Feeney RE. Analysis fraction and purification of egg white proteins with cellulose cation exchanger. *J Biol Chem* 1958; 23: 239-408.
 14. Awade AC, Moreau S, Molle D, Brule G, Maubois JL. Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins. *J Chromatogr (A)* 1994;677:279-288.
 15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
 16. Roe S. *Protein Purification Techniques*. 2nd ed. Oxford : Oxford university press , 2001: 28-32.
۱۷. دین محمدپور فروغه، پزشکی محمد. تفکیک و تخلیص آنتی ژنهای سفیده‌ی تخم مرغ. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان*، سال هشتم، شماره ۴، ۱۳۸۰: ۱۹-۱۴.