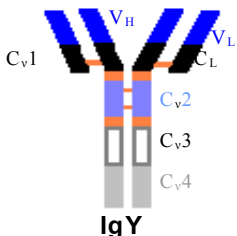
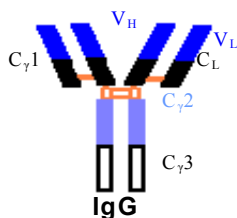


EggsPure IgY

TROUSSE DE PURIFICATION DES IgY : protocole en 60 minutes



Comparaison de la structure d'une IgG et d'une IgY

Introduction

Les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunitaire est comparable à celle des mammifères mais présente l'avantage d'être plus rapide. L'utilisation des poules est considérée comme un raffinement de la technique de production d'anticorps en réduisant le stress et la souffrance des animaux (Règle des 3R par Russel et Burch, 1969). Les anticorps sont extraits à partir du jaune d'œuf et aucun prélèvement de sérum n'est nécessaire.

Les poules pondent chaque jour un œuf contenant de 50 à 100 mg d'anticorps (IgY) de masse moléculaire ~ 180kDa.

Contrairement aux IgG, les IgY :

- Ne fixent pas le récepteur Fc des mammifères,
- N'activent pas les protéines du complément.
- Résistent à des pH acides et à des conditions de force ionique drastiques.

D'un point de vue fonctionnel, les IgY se comportent comme un F(ab')₂ mais possè-

dent un fragment Fc plus important que les IgG.

La présence de nombreux lipides dans le jaune d'œuf et l'absence d'affinité des IgY pour les protéines A et G rend la purification des anticorps complexe.

La trousse *EggsPure IgY* propose une méthode simple, rapide et efficace pour la purification des IgY à partir du jaune d'œuf. Vous obtiendrez en moyenne 50 mg d'IgY totales par œuf, d'une pureté supérieure à 90%.

Les IgY purifiées grâce à cette trousse sont directement utilisables dans des applications ELISA, en cytométrie de flux, en chromatographie, en immunoblot et pour des techniques de purification d'affinité. Les IgY spécifiques peuvent aisément être purifiées à partir des IgY totales en appliquant la technique de purification d'affinité en couplant l'immunogène sur une colonne de chromatographie. Ces anticorps spécifiques représentent 2 à 10% des anticorps totaux contenus dans chaque jaune d'œuf.

Composition de la trousse

1. Contenu de la trousse pour l'extraction de 6 œufs (100 ml de jaune) :

EggsPure IgY 6

LT01110

- Réactif A : 420 mL
- Réactif B : 380 mL
- Réactif C : 265 mL
- Séparateur de jaune Agro-Bio
- 6 papiers filtres
- 2 crochets plastiques

2. Contenu de la trousse pour l'extraction de 12 œufs (200 ml de jaune) :

EggsPure IgY 12

LT01111

- Réactif A : 2 x 420 mL
- Réactif B : 2 x 380 mL
- Réactif C : 2 x 265 mL
- Séparateur de jaune Agro-Bio
- 12 papiers filtres
- 2 crochets plastiques

Matériel nécessaire, mais non fourni :

- Tampon phosphate salin (PBS 1X)
- Centrifugeuse
- Entonnoir
- Agitateur magnétique
- Spatule
- Éprouvettes graduées

Protocole d'utilisation



Séparation du jaune d'œuf

Note :
6 œufs (100 mL de jaune) peuvent être extraits simultanément avec la trousse LT01110 et 12 œufs (200 mL de jaune) avec la référence LT01111.

Note :
Les œufs peuvent être conservés à 2-8°C avant extraction.

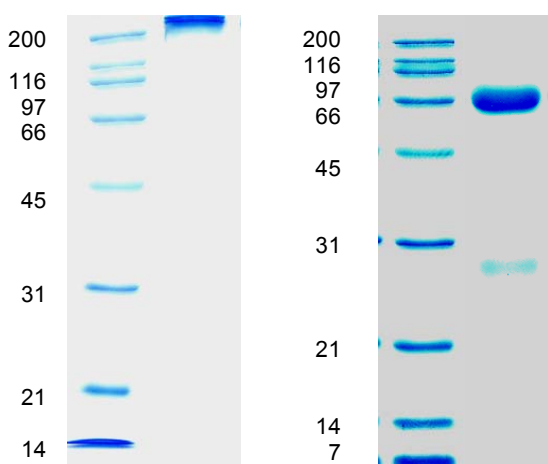


Élimination de la membrane vitelline

Note :
Ce kit fonctionne également avec les œufs de cane, de caille et d'oie.

Note :
Une trame d'enregistrement en format papier est fournie avec chaque trousse pour faciliter le calcul des volumes de solutions A, B et C selon le nombre d'œufs utilisés.

Vous pouvez également obtenir une trame de calcul automatique informatique en nous contactant au 02.38.64.83.50.



Electrophorèse des IgY extraites avec le kit EggsPure IgY

Gauche : en conditions non réductrices (présence d'une bande à 200 kDa)

Droite : conditions réductrices (2 bandes à 60-70 kDa et à 25 kDa)

1. Séparation du jaune d'œuf

Casser l'œuf dans un béccher en utilisant le séparateur d'œuf de manière à ne récupérer que le jaune. (Placer les œufs à température ambiante* 30 minutes avant l'extraction de manière à ce que le blanc d'œuf s'écoule plus rapidement).

Disposer ensuite le jaune dans une assiette et éliminer la membrane vitelline à l'aide des crochets fournis dans la trousse.

Mesurer le volume (V1) de jaune d'œuf disponible à l'aide d'une éprouvette de 500 mL (pour 6 œufs), préalablement rincée au PBS.

2. Délipidation par précipitation

Ajouter 4 x V1 mL de la solution A dans l'éprouvette, homogénéiser puis placer sous agitation magnétique durant 5 minutes à TA. Le mélange est ensuite transvasé dans un tube à centrifuger (1L).

Centrifuger la solution 10 minutes à 2000xg à TA. Passer ensuite le surnageant sur un papier filtre disposé sur un entonnoir et mesurer le volume du filtrat récupéré dans une éprouvette graduée (1L).

3. Précipitation des protéines

Diluer le filtrat dans un volume égal de la solution B puis homogénéiser 5 minutes à TA sous agitateur magnétique.

Centrifuger la solution 10 minutes à 2000xg à TA.

4. Extraction des IgY

Le surnageant est éliminé et le culot est repris à l'aide d'une spatule dans 2,5 x V1 de solution C (Bien gratter le culot avec une spatule et vortexer pour faciliter sa reprise en solution. Attention, le culot est transparent et donc difficile à observer).

Le mélange est ensuite homogénéisé 5 minutes à TA sous agitation magnétique.

Centrifuger 10 minutes à 2000xg à TA puis éliminer le surnageant et solubiliser le culot dans 0,5 x V1 de PBS 1X (Une concentration en IgY de l'ordre de 5 mg/mL est obtenue avec une pureté supérieure à 90%).

Les IgY extraites peuvent être conservées à 2-8°C durant 18-24 mois.

*température ambiante = TA = 18°-25°C

5. Détermination de la concentration des IgY

Passer en spectrophotométrie les IgY extraites diluées au 1/10e et mesurer l'absorbance à 280 nm.

$$\text{Concentration IgY} = A(280) \times 10 \times 0,74 \text{ mg/mL}$$