

PURIFIKASI AFINITAS KANDIDAT RESEPTOR IMUNOGLOBULIN Y PADA SEL GRANULOSA FOLIKEL OVARIUM AYAM PETELUR

(Affinity Purification Of Putative Receptor Of Immunoglobulin Y From Granulosa Cells Of Hens Ovarian Follicle)

Umul Karimah^{1,2}, Sony Heru Sumarsono²

¹ Program Studi Farmasi, Universitas Nahdlatul Ulama Kalimantan Timur, Samarinda, Kalimantan Timur Email: ukarimah@gmail.com

² Program Studi Bioteknologi, Laboratorium Fisiologi Perkembangan Hewan dan Sains Biomedika, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH), Institut Teknologi Bandung, Bandung, Jawa Barat

ABSTRACT

Protein isolation is the primary step in protein investigation. Methods for isolating protein depend on protein solubility, size, charge and affinity. Immunoglobulin Y (IgY) is the major antibody in avian immune system and presents in high amount in egg yolk. Its transfer from hen blood to the egg yolk requires specific receptor which is long predicted as a membrane protein of granulosa cells. This research aimed to isolate the putative receptor of IgY from membrane protein of granulosa cells with affinity purification method. Pure IgY was immobilized to CNBr-activated Sepharose 4B matrix as affinity ligand. Membrane proteome of granulosa cells from F1-F3 follicles was incubated in this affinity matrix with PBS pH 8,0. Fraction eluted with PBS pH 6,0 was examined with SDS-PAGE in reducing condition and showed 68 kDa band with very high intensity. This 68 kDa protein is putative receptor of IgY in granulosa cells membrane.

Keywords: *affinity; granulosa cells; immunoglobulin Y; receptor.*

PENDAHULUAN

Protein adalah polimer dari asam amino. Biomolekul ini memiliki keragaman struktur yang sangat tinggi yang menyebabkan protein dapat menjalankan fungsi-fungsi biologis. Protein dapat menjadi bagian struktural sel atau organisme, enzim, hormon, antibodi, kanal ion, reseptor, toksin, pengangkut dan penyimpan (Koolman dan Roehm 2005). Langkah utama mempelajari protein adalah pemurnian protein (Berg dkk. 2002). Protein diisolasi terlebih dahulu untuk kemudian dapat dipelajari urutan asam amino, hubungan evolusi antarorganisme dan fungsi biokimiawinya (Berg dkk. 2002). Disamping protein dipelajari secara khusus, protein juga dipelajari pada tingkat yang lebih tinggi misalnya dengan

imunohistokimia (Duraiyan dkk. 2012) dan studi proteomik (Graves dan Haystead 2002).

Imunoglobulin adalah protein yang dihasilkan oleh sel limfosit yang mampu mengenali antigen secara sangat spesifik. Unggas menghasilkan tiga isotipe imunoglobulin yakni IgM, IgA dan IgY (Leslie dan Clem, 1969). Selain terdapat pada serum, IgY secara eksklusif terdapat dalam kuning telur. Deposit IgY dalam kuning telur adalah bentuk transfer imun pasif dari induk kepada anakan (Szabo, 2012). Istilah imunoglobulin Y yang diberikan oleh Leslie dan Clem (1969) mengacu pada jumlah IgY yang tinggi pada kuning telur atau "yolk".

Perpindahan IgY dari serum ke kuning telur akan melewati berbagai sel penyusun komposit folikel dan ukuran IgY yang mencapai ~179 kDa membutuhkan mekanisme transfer khusus. Menurut Loeken

dan Roth (1983) terdapat reseptor spesifik pada folikel ovarium yang mentransfer IgY dari darah induk ke kuning telur. Reseptor IgY untuk proses transfer ini belum teridentifikasi (Bae dkk. 2009) namun Kitaguchi dkk. (2010) menemukan sinyal pengikatan fragmen terkristalisasi (*crystallizable fragment*, Fc) dari IgY ayam pada lapisan sel granulosa dan/ atau perivitelin dari jaringan folikel ovarium burung puyuh.

Keberadaan reseptor IgY pada sel granulosa folikel ovarium unggas yang memindahkan IgY dari serum ke kuning telur perlu dibuktikan. Penelitian ini melakukan isolasi kandidat reseptor IgY pada sel granulosa folikel ovarium ayam petelur dengan metode purifikasi afinitas. Hal ini memiliki tantangan tersendiri karena protein reseptor umumnya terletak pada membran sel dan jumlahnya sedikit. Penelitian ini memaparkan tahapan isolasi kandidat reseptor IgY secara rinci termasuk tahap isolasi sel, pemilihan buffer dan pewarnaan protein.

METODE PENELITIAN

Folikel ovarium ayam petelur diperoleh dari Pasar Kosambi, Bandung. Folikel ovarium yang digunakan memiliki diameter 2,7-3,6 cm dengan bobot 12-14 g. Berdasarkan keterangan penyedia bahan, folikel ovarium berasal dari ayam petelur yang sudah melewati usia produktif dan dijadikan ayam pedaging.

Isolasi Sel Granulosa

Sel granulosa diisolasi sesuai metode Gilbert dkk. (1977) dengan modifikasi. Lapisan theca luar pada folikel ovarium dikupas menggunakan pinset, folikel kemudian dilubangi dan perlahan dibalik sehingga bagian dalam folikel ovarium menghadap keluar dan kuning telur dibiarkan mengalir. Kuning telur dikumpulkan untuk isolasi IgY. Lapisan komposit yang diperoleh dibilas dengan akuadeion hingga bersih kemudian membran perivitelin yang akan

nampak di sisi dalam folikel ovarium ditarik perlahan dan dikumpulkan dalam cawan petri. Membran perivitelin dibilas dengan akuadeion kemudian dibilas dengan 1 mL PBS (2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 150 mM NaCl, pH 7,4 yang mengandung 0,05% v/v gliserol) untuk melepas sel granulosa yang menempel. Isolat sel granulosa dalam buffer PBS disimpan pada -80°C. Sebelum digunakan, isolat sel dicairkan secara cepat (*thawing*) lalu disentrifugasi pada 850x g selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet sel ditambah dengan 1 mL PBS dan disentrifugasi kembali pada kecepatan yang sama. Pelet yang diperoleh disuspensi ke dalam 500 µL PBS sebelum tahap ekstraksi protein membran dilakukan. Secara acak diambil isolat sel untuk pengamatan dengan mikroskop fase kontras Nikon Eclipse TE300.

Ekstraksi Protein Membran Sel Granulosa

Ekstraksi protein dilakukan dengan *Mem-PERTM Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit* (Thermoscientific) sesuai petunjuk kit. Hasil akhir ekstraksi adalah suatu campuran yang terdiri dari dua fase. Fase atas berisi protein hidrofilik dan fase bawah berisi protein hidrofobik. Protein membran sel granulosa berada pada fase protein hidrofobik dan selanjutnya digunakan dalam purifikasi afinitas.

Isolasi Immunoglobulin Y untuk Ligan Purifikasi Afinitas

Isolasi IgY dilakukan dengan *PierceTM Chicken IgY Purification Kit* (Thermoscientific) sesuai dengan petunjuk kit. Pelet IgY yang diperoleh dilarutkan dalam PBS (100 mM NaHPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,2) hingga mencapai 10 mL. Konsentrasi protein pada isolat IgY ditentukan dengan pengukuran absorbansi pada 280 nm (A_{280nm}) dan pengenceran 20 kali dengan rumus:

$$\text{Konsentrasi protein (mg/mL)} = \frac{Abs \times 20}{1,4}$$

Isolat IgY diperiksa kemurniannya dengan elektroforesis *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) reduktif dan non reduktif.

Penyiapan Matriks Purifikasi Afinitas

Sebanyak 0,2 gram matriks CNBr-*activated Sepharose 4B* diaktifkan sesuai Amersham Pharmacia Biotech (2001). Matriks dibilas dengan 600 μ L buffer pemasangan (0,2 M NaHCO₃ pH 8,3 yang mengandung 0,5 M NaCl) dan disentrifugasi 3.000x *g* selama 30 s. Supernatan dibuang dan matriks yang telah teraktivasi diolah sesuai metode berikutnya.

Imobilisasi IgY pada Matriks Purifikasi Afinitas

IgY didialisis dengan *Servapor dialysis tubing* (MWCO 12.000-14.000) dalam PBS pH 7,2 sebanyak 2x masing-masing 2 jam lalu didialisis dalam buffer pemasangan 1x 2 jam. Sebanyak 400 μ L IgY ditambahkan ke matriks yang telah diaktifkan pada tahap sebelumnya lalu diinkubasi sambil dikocok selama 1 malam pada 4°C. Matriks dipisahkan dari ligan IgY yang tidak terikat dengan sentrifugasi pada 3.000x *g* selama 5 menit. Larutan IgY sebelum dan sesudah imobilisasi diukur absorbansinya pada 280 nm (A_{280nm}) untuk memeriksa persentase efisiensi imobilisasi IgY dalam matriks. Selanjutnya dilakukan pencucian matriks dan blok terhadap gugus aktif bebas sesuai Amersham Pharmacia Biotech (2001). Matriks kemudian dibilas dengan 600 μ L buffer pengikatan (PBS yang terdiri dari 2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 150 mM NaCl pH 8,0), disentrifugasi 3.000x *g* selama 5 menit kemudian supernatannya dibuang.

Purifikasi Afinitas untuk Isolasi Kandidat Reseptor IgY

Fraksi hidrofobik protein membran sel granulosa didialisis dalam buffer pengikatan 2x masing-masing 2 jam. Sebanyak 1,2 mL fraksi protein hidrofobik

ditambahkan ke matriks afinitas lalu diinkubasi selama satu malam dengan pengocok pada 4°C. Campuran matriks dan fraksi protein hidrofobik kemudian dipindahkan ke mikrotub berfilter dan disentrifugasi pada 3.000x *g* selama 5 menit. Filtrat yang diperoleh disisihkan. Matriks dicuci dengan penambahan 600 μ L buffer pengikatan dilanjutkan sentrifugasi 3.000x *g* 3 menit. Tahap pencucian dilakukan sebanyak 5x. Filtrat pencucian diperiksa dengan SDS-PAGE reduktif. Untuk mengeluarkan protein yang terikat secara spesifik pada ligan IgY, matriks dielusi dengan 200 μ L buffer elusi (PBS yang terdiri dari 2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 150 mM NaCl pH 6,0). Matriks diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit lalu di sentrifugasi 3.000x *g* selama 5 menit. Eluat buffer elusi PBS pH 6,0 dipekatkan dengan aseton kemudian diperiksa dengan SDS-PAGE reduktif.

Elektroforesis SDS-PAGE

Protein dipisahkan dengan elektroforesis sistem Laemmli (1970) pada 10% gel poliakrilamida pemisah (*resolving gel*) dalam kondisi reduktif atau non-reduktif (sesuai dengan keterangan). Protein penanda yang digunakan adalah *SeeBlue Pre-stained Standard* (Novex Life Technologies). Elektroferogram IgY diwarnai dengan Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG-250), sementara elektroferogram protein membran sel granulosa dan hasil purifikasi afinitas diwarnai dengan pewarnaan perak. Jarak migrasi pita protein standar dan bobot molekulnya diplot dalam grafik mengikuti persamaan yang sesuai (eksponensial atau polinomial *second-order*) dan digunakan untuk menentukan bobot molekul pita yang diperoleh.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Sel Granulosa dan Ekstraksi

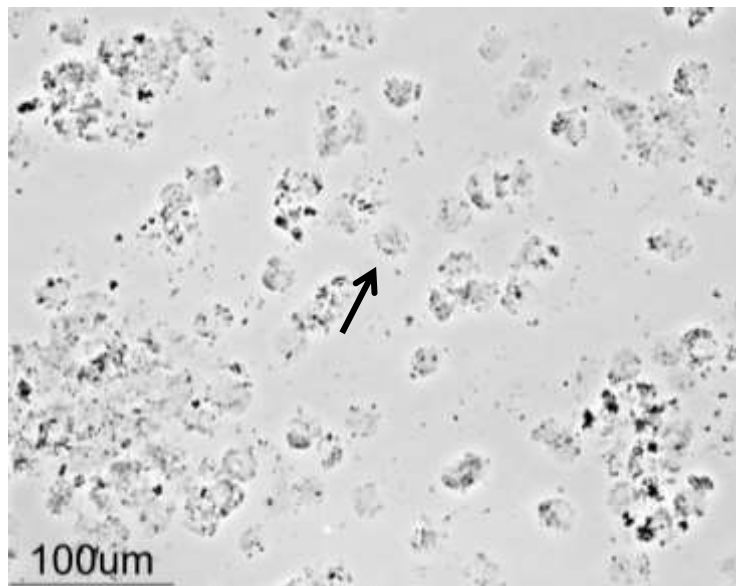
Protein Membran

Sel granulosa dan IgY berasal dari kelompok folikel ovarium yang sama. Hal ini

menjamin homogenitas sumber sel granulosa dan IgY. Tujuannya adalah meningkatkan peluang kompatibilitas kandidat reseptor dan IgY sebagai ligan. Namun demikian telah ada laporan bahwa reseptor IgY pada folikel unggas dapat memindahkan imunoglobulin dari spesies unggas lain (Mohammed dkk. 1988, Bae dkk. 2009).

Sel granulosa yang diisolasi pada penelitian ini berbentuk bulat, memiliki tepi yang kurang halus, dan banyak granul (Gambar 1). Morfologi sel yang teramati ini sesuai laporan Gilbert dkk. (1977) yang mengisolasi sel granulosa dari folikel ayam berukuran 8-15 gram. Folikel ovarium yang digunakan berada pada tahap pematangan folikel (Gilbert dkk. 1977) yakni F3-F1 (Eresheim dkk. 2014). Pemilihan folikel pada

tahap F3-F1 untuk mempelajari kandidat reseptor IgY telah sesuai karena deposisi IgY ke kuning telur sedang berlangsung. Perry dkk. (1978) membagi deposisi protein dan lipid ke kuning telur dalam dua tahap, yakni tahap deposisi protein pada *white yolk* selanjutnya deposisi lipid pada *yellow yolk* dan folikel prehirarki. Namun pembagian tahap deposisi ini tidak bersifat absolut karena Loeken dan Roth (1983) melaporkan 0,2 g IgY ditransfer selama 6 hari terakhir maturasi folikel. Selain itu, Kitaguchi dkk. (2010) menemukan sinyal pengikatan antibodi oleh reseptor di sel granulosa pada folikel ovarium F2 burung puyuh. Kedua laporan tersebut menunjukkan transfer IgY masih berlangsung hingga folikel ovarium memasuki tahap sebelum ovulasi.



Gambar 1. Isolat sel granulosa menunjukkan bentuk sel membulat dan bergranul, tanda panah menunjukkan sel tunggal (perbesaran 20x).

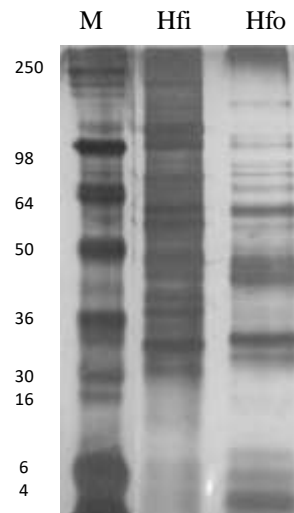
Interaksi imunoglobulin dan reseptor secara umum diawali di permukaan membran sel sehingga penelitian ini mengisolasi protein membran sel granulosa. Isolasi protein membran dapat dilakukan berdasarkan kelarutan protein, penggunaan deterjen, atau pemisahan organel sesuai densitas. Penggunaan deterjen memberikan persentase hasil terbesar (Lehner dkk. 2003). Interaksi fosfolipid dengan daerah non-polar

dari protein membran digantikan oleh deterjen yang ditambahkan pada konsentrasi tinggi. Struktur yang terbentuk antara protein membran dengan molekul deterjen disebut misel. Misel yang terdiri dari protein membran dan deterjen Triton X-114 akan mengalami dehidrasi pada inkubasi di atas *cloud point* dari Triton X-114 yakni 23°C. Dehidrasi akan mengakibatkan fase hidrofobik berisi misel terpisah dari fase

hidrofilik. Pemisahan kedua fase tersebut ditingkatkan efektivitasnya dengan sentrifugasi.

Protein membran sel granulosa berhasil diisolasi dengan kit berbasis deterjen yang telah dilaporkan efektivitasnya oleh Hongsachart dkk. (2008). Fase atas berisi protein hidrofilik dan fase bawah berisi protein hidrofobik dalam misel Triton X-114. Protein membran sel granulosa berada pada

fase bawah yakni fase protein hidrofobik. Hasil SDS-PAGE menunjukkan kedua fase isolat protein sel granulosa memiliki profil elektroferogram yang berbeda yang menandakan kedua golongan protein telah terpisah dengan baik (Gambar 2). Fraksi protein hidrofobik berisi protein membran sel granulosa selanjutnya dipurifikasi dalam matriks afinitas berisi IgY untuk mengisolasi kandidat reseptor IgY.



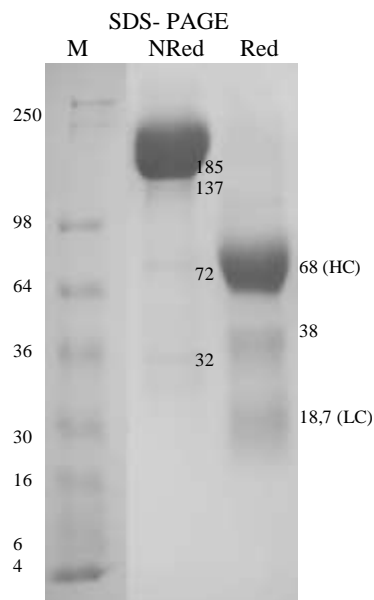
Gambar 2. Fraksi protein hidrofilik (Hfi) dan hidrofobik (Hfo) dari tahap ekstraksi protein membran sel granulosa.

Imunoglobulin Y sebagai Ligan Purifikasi Afinitas

Isolat IgY yang diperoleh memiliki konsentrasi 6,23 mg/mL. Konsentrasi IgY yang diisolasi dari kuning telur berbeda-beda bergantung metode (Bizhanov dan Jonauskiene, 2003; Liou dkk. 2011). Isolat IgY perlu memiliki kemurnian yang tinggi untuk dapat digunakan sebagai ligan purifikasi afinitas. Hal ini jelas untuk menghindari pengikatan yang tidak selektif. Pemeriksaan isolat IgY dilakukan dengan SDS-PAGE pada kondisi nonreduktif dan reduktif. Elektroferogram SDS-PAGE non-reduktif menunjukkan pita IgY berukuran ~185 kDa dengan intensitas yang tinggi tanpa adanya pita lain yang signifikan (Gambar 3). Elektroferogram SDS-PAGE pada kondisi reduktif menghasilkan pita rantai ringan (~18,7 kDa), rantai berat (~68 kDa) dan pita ~38 kDa (Gambar 3). Hasil ini sedikit

berbeda dengan laporan Leslie dan Clem (1969) bahwa IgY memiliki bobot molekul ~179 kDa, dengan rantai berat berukuran 67,5 kDa dan rantai ringan berukuran 22 kDa.

Elektroferogram juga menunjukkan pita berukuran ~38 kDa yang cukup tebal. Hal ini serupa dengan laporan Criste dkk. (2009) bahwa isolat IgY dari ayam, burung puyuh, dan itik menghasilkan tiga pita yakni rantai ringan, rantai berat dan pita berukuran mendekati 35 kDa. Pita ini mengindikasikan suatu isoform IgY dengan rantai berat yang terpotong di bagian Fc atau IgY(Δ Fc). Pita 35 kDa terdeteksi di ketiga jenis unggas namun paling tebal pada itik sehingga tidak banyak laporan tentang isoform ini di spesies lain. Isoform IgY tanpa daerah Fc dapat ditransfer ke kuning telur dengan mekanisme endositosis fase cair (Kitaguchi dkk. 2010) yang tidak melibatkan reseptor.



Gambar 3. Pemisahan IgY dengan SDS-PAGE pada kondisi non-reduktif (NRed) dan reduktif (Red),

Pita elektroferogram yang dihasilkan IgY tidak tajam karena kandungan karbohidrat sebesar 3% yang dimiliki IgY (Davalos-Pantoja dkk. 2000). Glikosilasi menyebabkan pengikatan bromfenol biru pada polipeptida tidak merata sehingga pita yang dihasilkan tidak tajam. Glikosilasi berperan penting dalam proses pengenalan oleh reseptor (Purzel dkk. 2009). Dari hasil ini disimpulkan bahwa IgY telah diisolasi dengan kemurnian yang baik. IgY kemudian diimmobilisasi dalam matriks CNBr-*activated sepharose* 4B sebagai ligan untuk purifikasi afinitas.

Purifikasi Afinitas untuk Mengisolasi Kandidat Reseptor IgY

IgY telah dipasang ke matriks CNBr-*activated sepharose* 4B dengan efisiensi pemasangan ligan sebesar 71% (data tidak ditunjukkan). CNBr-*activated sepharose* 4B digunakan sebagai matriks untuk ligan berukuran lebih dari 5 kDa. Ester sianat pada CNBr-*activated sepharose* 4B yang reaktif dapat berikatan dengan gugus nukleofilik seperti gugus amino primer yang terdapat pada protein, peptida, asam amino, dan DNA. Kedua gugus tersebut membentuk

ikatan isourea secara spontan (Amersham Pharmacia Biotech, 2001).

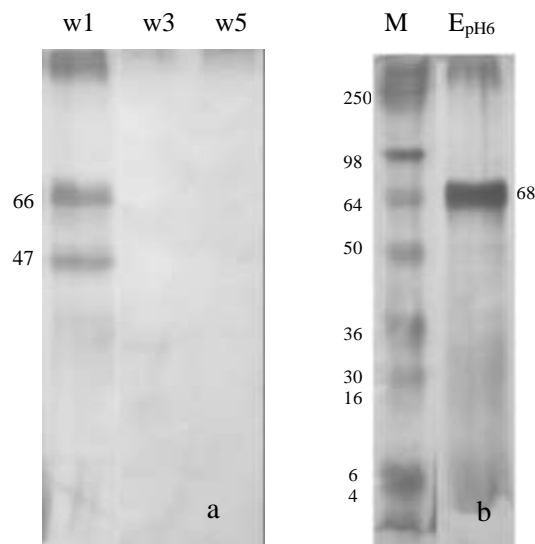
IgY diimmobilisasi ke matriks CNBr-*activated sepharose* 4B melalui gugus amino primer pada ujung N dan semua gugus amino primer pada rantai samping residu lisin dan arginin. Sementara itu ujung C dari IgY terletak pada Fc yang merupakan bagian yang dikenali oleh reseptor. Murai dkk. (2013) melaporkan residu tirosin (Y363) antara domain C ν 3 dan C ν 4 dan glikosilasi pada residu asparagin (N407) dari molekul IgY adalah bagian paling penting yang dikenali oleh reseptor IgY pada folikel.

Buffer elusi yang digunakan adalah PBS pH 6,0 dan merupakan penyesuaian terhadap metode yang digunakan dalam metode purifikasi afinitas oleh West dkk. (2004). Kuning telur bersifat asam sementara darah bersifat agak basa. West dkk. (2004) menggunakan buffer pengikatan PBS pH 6,0 dan buffer elusi PBS pH 8,0 untuk mengisolasi FcRY, reseptor IgY pada *yolksac* yang berperan dalam transfer IgY dari kuning telur ke darah embrio ayam. Sebaliknya, dalam penelitian ini, karena kandidat reseptor yang ingin dicari berperan dalam transfer IgY

dari darah ke kuning telur maka buffer pengikatan adalah PBS pH 8,0 dan buffer elusi adalah PBS pH 6,0.

Elektroferogram hasil bilasan dengan buffer pengikatan pertama (w1), ketiga (w3), dan kelima (w5) ditunjukkan pada Gambar 4a. Proses pembilasan menghilangkan semua protein yang tidak terikat ke matriks. Elektroferogram bilasan pertama (w1)

menunjukkan pita yang tebal berukuran 66 dan 47 kDa. Kedua protein tersebut diduga adalah protein yang terikat secara lemah pada ligan IgY atau komponen matriks afinitas lainnya. Namun kedua protein tersebut tidak terdeteksi di w3 dan w5 yang artinya semua protein yang tidak terikat secara spesifik pada ligan IgY sudah terbilas keluar dari matriks.



Gambar 4 Elektroferogram SDS-PAGE reduktif pada beberapa tahapan purifikasi afinitas: (a) Bilasan pertama (w1); ketiga (w3); dan kelima (w5) dengan buffer pengikatan PBS pH 8,0.

Eluat dari buffer elusi PBS pH 6,0 menunjukkan pita tebal berukuran 68 kDa (Gambar 4b). Protein berukuran 68 kDa yang terelusi pada PBS pH 6,0 tertahan dalam matriks dan diduga merupakan kandidat reseptor IgY pada sel granulosa. Mengacu pada bobot rata-rata residu asam amino sebesar 110 Da (Nelson dan Cox 2004), protein berukuran 68 kDa terdiri dari ~618 residu asam amino. Reseptor imunoglobulin umumnya terdiri dari kompleks multisubunit dengan notasi α untuk subunit yang berperan dalam pengenalan antibodi. Subunit α dari reseptor Fc umumnya berukuran 40-75 kDa (Murphy, 2012). Protein dapat melintasi membran dengan membentuk salah satu dari dua struktur yakni heliks α atau lembaran β .

Protein yang membentuk heliks α membutuhkan 20-30 asam amino yang sangat hidrofobik untuk melintasi membran. Sementara itu, protein dengan struktur lembaran β hanya membutuhkan 10 residu atau bahkan kurang dari itu (Alberts dkk. 2008).

Kandidat reseptor IgY yang diperoleh dari purifikasi afinitas pada penelitian ini adalah yang pertama diperoleh dari sel granulosa folikel ovarium. Purifikasi afinitas kandidat reseptor IgY terhadap protein membran sel granulosa ini berhasil mengisolasi protein berukuran 68 kDa dalam kualitas kemurnian yang sangat baik mengingat sensitivitas pewarnaan perak yang digunakan. Namun protein kandidat reseptor

IgY pada sel granulosa ini perlu diuji lebih lanjut untuk mengidentifikasi fungsinya secara akurat misalnya dengan imunohistokimia.

KESIMPULAN

Purifikasi afinitas protein membran sel granulosa terhadap IgY dalam matriks *CNBr-activated Sepharose 4B* berhasil mengisolasi suatu protein membran sel granulosa berukuran 68 kDa yang merupakan kandidat reseptor imunoglobulin Y.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Martin, R., Roberts, K., dan Walter, P. (2008): *Molecular Biology of The Cell*. Ed. ke-5. Garland Sciences, New York.
- Amersham Pharmacia Biotech. (2001): *Affinity Chromatography: Principles and Methods*. www.apbiotech.com.
- Bae, H. D., Kitaguchi, K., Horio, F., dan Murai, F. (2009): Higher incorporation of heterologous chicken immunoglobulin Y compared with homologous quail immunoglobulin Y into egg yolks of Japanese quail (*Coturnix japonica*), *Poultry Science*, 88, 1703-1711.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., dan Stryer, L. (2002): *Biochemistry*. Ed. ke-5. WH Freeman, New York.
- Biemann, K. dan Papayannopoulos, I. A. (1994): Amino acid sequencing proteins, *Acc Chem Res*, 27, 370-378.
- Bizhanov, G, dan Jonauskiene, I. (2003): Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG, *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy*, 47, 403-410.
- Criste, A., Fit, N., dan Boaru, A. (2009): The molecular and morphological characterization of the polyclonal antibodies isolated from poultry eggs, *Animal Science and Biotechnology*, 66, 380-384.
- Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vineusa, J.L., Bastos-Gonzalez, D., Hidalgo-Alvarez, R. (2000): A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particle, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11, 657-663.
- Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., dan Palanisamy, M. (2012): Applications of immunohistochemistry, *J Pharm Bioallied Sci* (4): S307-S309.
- Eresheim, C., Leeb, C., Buchegger, P., Nimpf, J. (2014): Signal transduction: signalling by the extracellular matrix protein reelin promotes granulosa cell proliferation in the chicken follicle, *Journal of Biological Chemistry*, 1-20.
- Graves, P. R., dan Haysted, T. A. J. (2002): Molecular biologist's guide to proteomics, *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 39-63.
- Gilbert, A. B., Evans, A. J., Perry, M. M., dan Davidson, M. H. (1977): A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *J. Reprod. Fertil*, 50, 179-181.
- Hongsachart, P., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Wongkham, W., dan Chen, S.T. (2008): Comparative Membrane Extraction Methods for Identifying Membrane Proteome of SW900 Squamous Lung Cancer Cell Line,

- Chiang Mai Journal of Science*, 35, 467-482.
- Koolman, J., dan Roehm, K. H. (2005): *Color Atlas of Biochemistry*. Ed. ke-2. Thieme, Stuttgart.
- Kitaguchi, K., Bae, H. D., Sasanami, T., Kobayashi, M., Horio, F., dan Murai, A. (2010): Microscopic detection of IgY-Fc binding signal in the inner layers of ovarian follicular tissue in quail, *Animal Science Journal*, 5, 580-585.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lehner, I., Niehof, M., dan Borlak, J. 2003. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins, *Electrophoresis*, 24, 1795-1808.
- Leslie, G. A. dan Clem, L. W. (1969): Phylogeny of immunoglobulin structure and function, *Journal of Experimental Medicine*, 130, 1337-1351.
- Liou, J. F., Shiau, J. W., Tai, C., dan Chen, L. R. (2011): Production of egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from *White Leghorn* and *Lohmann chickens*, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 18, 2349-2356.
- Loeken, M.R., dan Roth, T.F. (1983): Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into chicken oocyte, *Immunology*, 49, 21-28.
- Mohammed S. M., Morrison, S., Wims, L., Trinh, K. R., Wildeman, A. G., Bonselaar, J., dan Etches, R. J. (1998): Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens, *Immunotechnology*, 4, 115-125.
- Murai, A., Murota, R., Doi, K., Yoshida, T., Aoyama, H., Kobayashi, M., dan Horio, F. (2013): Avian IgY is selectively incorporated into the egg yolks of oocytes by discriminating Fc amino acid residues located on the C₃/C₄ interface, *Developmental & Comparative Immunology* (Article in press).
- Murphy, K. (2012): *Janeway's Immunobiology*, Garland Science, New York, 127;159-193; 418-419.
- Nelson, D. L. dan Cox, M. M. (2004): *Lehninger Principles of Biochemistry*. WH Freeman & Co., New York.
- Perry, M. M., Gilbert, A. B., dan Evans, A. J. (1978): Electron microscope observations on the ovarian follicle of domestic fowl during the rapid growth phase, *Journal of Anatomy*, 125, 481-497.
- Purzel, J., Schmitt, R., Viertlboeck, B. C., dan Gobel, T. W. (2009): Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA:Fc α RI interaction, *Journal of Immunology*, 183, 4554-4559.
- Szabo, C. (2012): Transport of IgY from egg yolk to embryo, *Journal of Microbiology, Biotechnology, and Food Sciences*, 2, 612-620.
- West, A. P., Herr, A. B., dan Bjorkman, P. J. (2004): The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc Receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog, *Immunity*, 20, 601-610.