

## 재조합 가금 아데노바이러스 Fiber 2 단백질을 이용한 특이 난황 항체 생산

정경민 · 이 성 · 김정우<sup>†</sup>

단국대학교 생명자원과학대학 동물자원학과

### Production of Specific Egg Yolk Antibodies in Chicken against Recombinant Fowl Adenovirus Fiber 2 Protein

Kyung Min Jung, Seong Lee and Jung Woo Kim<sup>†</sup>

Department of Animal Resources and Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

**ABSTRACT** Fowl adenovirus (FAV) is an important cause of several diseases, which result in considerable economic losses to the poultry farm. An outer capsid protein of FAV, fiber 2 is essential for virus growth, assembly or spread. This study was performed to produce about 22 kDa of recombinant fiber 2 protein and to immunize in laying hens to acquire the specific IgY antibody against the recombinant fiber 2. Laying hens were immunized with the recombinant fiber 2 intramuscularly in the breast muscle by injection 4 times at intervals of three weeks. At 12 weeks, serum- and egg yolk-antibody titers of hens against fiber 2 were increased up to 430,000 and 414,000, respectively. The recombinant fiber 2 could be recognized by the anti-His monoclonal antibody. Anti-fiber 2-IgY antibody could recognize the fiber 2 specifically in western blot analysis. These results suggested that the recombinant fiber 2 antigen could be used as an immunogen to elicit IgY antibody against fiber 2 and the anti-fiber 2-IgY could neutralize fowl adenovirus fiber 2 effectively.

(Key words : recombinant FAV fiber 2, IgY, immune reaction)

## 서 론

가금 아데노바이러스(Fowl adenovirus; FAV)는 가금에서 호흡기 질환, 심낭수종, 봉입체 간염, 근위 미란 등을 유발하는 주요 원인체로서 전 세계적으로 발생하고 있으며, 감보로병이나 닭 전염성 빈혈증과 같은 다른 질병과 복합 감염 시 면역 억제를 유발하여 피해가 매우 심각해진다고 알려져 있다 (Adair and Fitzgerald, 2008; Nandi et al., 2000; Hoerr FJ, 2010).

FAV의 주요 capsid 단백질로는 hexon, penton base, fiber 가 있다. 그 중 fiber는 세포 수용체 결합 부위를 포함하고 있으며, 바이러스의 병원성이나 면역원성과 관련이 있다. Fiber는 short fiber(fiber 2)와 long fiber(fiber 1)로 구분되는데, 이 중 fiber 2는 가금 내 바이러스의 성장과 전파에 주요한 역할을 하기 때문에, 이 연구에서는 fiber 2를 target으로 재조합 항원을 제작하였다(McFerran et al., 2000; Hess et al., 1995; Pallister et al., 1996; Bradley et al., 2012).

현재 양계산업의 사육환경은 과거에 비해 상당히 개선되어 어린 닭의 FAV 감염 기회가 상대적으로 감소하였으나, 산란기에 FAV에 노출될 경우, 수직 감염으로 인한 피해를 예방하기 어려운 것이 현실이다. 따라서 이에 대한 대처 방안이 필요하다. 아직까지는 FAV의 예방 및 치료를 위한 항체 요법은 연구된 바 없으며, 따라서 이 연구에서는 FAV에 대한 난황 항체를 개발하여 그 특성을 규명하고자 하였다. 난황 항체(Egg yolk antibody, IgY)는 난황 중에 이행된 모체의 항체를 말하는 것으로, 난생 동물에서 어미가 획득한 면역 항체를 자손에게 전달하는 방법의 일환으로 알려져 있으며, 산란계를 이용한 난황 항체를 사용 시 생산성과 경제성이 높고, 포유류와의 중간 특이성으로 인한 교차 반응이 적은 장점이 있어서, 최근 항체 생산은 물론 가축에서 감염성 질병 예방 및 치료 등에 광범위하게 사용되고 있다(Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Lee et al., 2009; Li et al., 2009). 더불어 가축의 사료 첨가제로 항생제를 사용하거나 질병 치료를 목적으로 사용되는 항생제의 오남용으로 항생제 내성균

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : kijuw@dankook.ac.kr

문제가 심각해지고 있는 상황에서, 항생제를 대체하여 질병의 예방과 치료에서 탁월한 효과를 발휘하는 난황 항체의 이용 가능성이 부각되고 있다(이희수 등, 2004; Kovacs-Nolan and Mine, 2004; Lee et al., 2009; Li et al., 2009; Mathew et al., 2009).

따라서 이 연구는 가금 아데노바이러스에 대한 예방 및 치료제 개발 연구의 일환으로, 재조합 FAV fiber 2 단백질 면역원을 제조하고, 이를 산란계에 면역하여 획득한 fiber 2에 대한 특이 항체(specific anti-fiber2-IgY)의 면역학적 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 바이러스 및 Fiber 2 유전자 재조합

가금 아데노바이러스(Fowl adenovirus)는 농림축산검역본부(경기도 안양시 만안구 안양로 175)로부터 분양 받아 사용하였다(KVCC-VR1100022). Fiber 2 유전자를 확보하기 위하여 가금 아데노바이러스의 genomic DNA를 분리하고, 이를 주형으로 PCR을 실시하였다. Genomic DNA의 분리는 Viral DNA Extraction Kit(Intron, Korea)를 사용하였으며, 추출된 genomic DNA를 주형으로 *Nhe* I site가 포함된 forward primer(5'-g gctagcctgtaccaagcggcccactag-3')와 *Xho* I site가 포함된 reverse primer(5'-g ctcgaggaccgtaacggggcgccgg-3')를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 Pro-DNi TC-25(Gnc Bio, Korea)를 이용하여 94°C에서 10분간 수행 후, 다음 단계에서 94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 2분간 35 cycles를 수행하였고, 마지막 단계에서 72°C 10분간 반응시킨 뒤 4°C에서 PCR 산물을 보관하였다.

증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인 후, TA cloning vector(RBC, Taiwan)에 클로닝한 다음, 염기서열 분석을 의뢰(Macrogen, Korea)하여 확인하였다. 확인된 클론에서 분리한 plasmid DNA를 제한 효소인 *Nhe* I 과 *Xho* I 으로 절단하였고, 6×His coding sequence를 갖는 발현 벡터인 pET-21d(+) vector(Novagen, Germany)를 동일한 제한 효소로 절단하여 다시 클로닝하였으며, 이를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 양성 클론을 선발하였다.

### 2. 재조합 Fiber 2 단백질의 발현

재조합된 pET-21d(+) 발현 벡터를 포함하고 있는 competent cell BL21(DE3)을 취하여 5 mL의 LB broth(DUCHEFA, Netherland)에 접종하여 37°C에서 14 시간 동안 200 rpm으로 혼

탕 배양을 실시한 다음, 500 mL의 LB broth에 배양액을 접종하여 흡광도(OD<sub>600</sub>)가 0.7~0.8이 되도록 37°C에서 3~4 시간 동안 200 rpm으로 혼탕 배양을 하였다. 추가적으로 0.5 mM의 IPTG(Isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside, DUCHEFA, Netherland)를 첨가한 후 3 시간 동안 배양한 다음, 원심분리하여 균체를 회수하였다.

재조합 단백질의 분리를 위하여 회수된 균체를 1× Triton X-100과 40 μg/mL의 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)가 첨가된 cell lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0)를 이용하여 재부유시키고, 최종 농도가 100 μg/mL가 되도록 lysozyme을 첨가하여 얼음 위에서 20 분간 방치하였다. 이후 얼리고 녹이는 과정을 세 번 반복하였고, 4°C, 10,000 × g에서 10 분 동안 원심분리를 하여 상층액과 침전물을 획득하였다. 침전물에 존재하는 단백질을 기존에 발표된 방법(He and Kwang, 2013)에 의해 가용화시켰다. 먼저 침전물에 washing buffer(0.01 M Tris-HCl, 0.1 M sodium phosphate buffer and 2 M urea, pH 8.0)를 첨가하여 실온에서 30 분간 방치한 후, 4°C, 10,000×g에서 10분 동안 원심분리하는 과정을 세 번 반복하였고, 이후 상층액에 denaturation buffer(0.01 M Tris-HCl, 0.1 M sodium phosphate buffer and 8 M urea, pH 8.0)를 첨가하여 얼음 위에서 1 시간 방치하였으며, 4°C, 10,000× g에서 30 분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 이를 투석 튜브와 1× PBS 2 L를 이용하여 실온에서 하룻밤 동안 투석하였다. 또한 상기에서 획득한 재조합 fiber 2 단백질의 농도 측정은 BCA 방법에 준하여 실시하였으며(Smith et al., 1985), 이를 산란계 면역에 사용하였다.

### 3. Western Blot Analysis

재조합 fiber 2 단백질 발현 여부를 확인하기 위해 Western blot analysis를 실시하였다. 음성대조군으로 발현 벡터인 pET-21d(+) vector를 이용하여 분석하였다. 먼저 monoclonal rabbit anti-His-Tag antibody(1 : 2,000) (KOMA biotech, Korea)를 반응시킨 후 2차 항체로 AP-conjugated goat anti-rabbit IgG(1 : 10,000) (Sigma, USA)를 반응시켜 재조합 fiber 2 단백질을 검출하였다. 또한 난황 항체를 이용하여 가금 아데노바이러스 내 fiber 2를 검출하기 위해 면역을 통해 얻은 난황 항체(1 : 10,000)를 1차 항체로 사용하였으며, secondary antibody로 AP-conjugated rabbit anti-chicken IgY(1 : 10,000) (Bethyl, USA)를 사용하여 fiber 2 단백질을 검출하였다. 모든 세척은 TBS-T(100 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20)로 4회 실시하였으며, NBT/BCIP stock solution

(Roche, Korea)으로 발색반응을 유도하였다.

#### 4. 시험 동물 및 면역 방법

이 연구를 위하여 26 주령 ISA-Brown계의 산란계 10 수를 시험 동물로 공시하였으며, 산란계는 단국대학교 생명자원과학대학 실험동물사육동에서 개별 사육하였다. 수행 시험 전 기간 동안 일일 16 시간 점등하였고, 온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며, 사료와 물은 자유 섭식하였다. 동물 실험은 단국대학교 동물실험윤리위원회의 허가를 취득하여 동물실험윤리위원회의 가이드라인에 따라 실험을 수행하였다 (DKU-11-007).

산란계 면역은 다음과 같이 실시하였다. 재조합 fiber 2 단백질 0.5 mL를 동량의 Freund's adjuvant(SIGMA, USA) 혼합하여 충분히 교반한 다음, 면역원으로 사용하였으며, 이를 산란계의 흉근 4 군데에 각각 0.25 mL씩 근육 주사를 실시하였다. 이러한 면역을 3 주 간격으로 총 4 회 수행하였다 (김정우 등, 2000).

#### 5. 혈청 및 난황에서 항체의 분리

혈청 내 항체를 측정하기 위하여 산란계의 익하정맥으로부터 혈액 1 mL를 채취하였다. 실온에서 30분간 응고시킨 뒤 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 상청의 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈청은  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하였다가 항체 측정 실험에 사용하였다. 매일 수거된 계란으로부터 난황 항체의 분리는 김정우 등(2000)의 방법에 따라 실시하였다. 채집한 난으로부터 난황만을 분리한 후 증류수(pH 5.0)로 10 배 희석하고, 다시 희석액을 pH 5.0로 적정한 후  $-20^\circ\text{C}$ 에서 24 시간 동결하였다. 동결된 난황 희석액을 해동시킨 다음,  $15^\circ\text{C}$ ,  $10,000 \times g$  로 30 분간 원심분리를 실시하여, 상층액을 수거하였고, 다시 수거액을  $8^\circ\text{C}$ 에서 Whatman No. 1(SIGMA, USA)으로 여과하여 수용성 난황 항체를 분리하여 항체 측정 실험에 사용하였다.

#### 6. 혈청 및 난황 내 항체 역가 측정

혈청과 난황으로부터 재조합 fiber 2 단백질에 대한 항체 역가를 분석하기 위하여 indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 실시하였으며, 그 측정 방법은 다음과 같다(김정우 등, 2000). Carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)에 재조합 fiber 2 단백질을  $5 \mu\text{g/mL}$ 가 되도록 혼합한 다음, MicrotestIII flexible Assay plate(Falcon, USA)에  $100 \mu\text{L}$ 씩 분주하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 정치하였다. 항원이 피복된 plate를 PBS-T( $0.02 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.13 \text{ M NaCl}$ ,  $0.05\% \text{ Tween-20}$ ,

pH 7.2)로 3 회 세척하였으며, blocking buffer( $5\% \text{ skim milk}$ , pH 7.3, Difco, USA)를  $175 \mu\text{L}$ 씩 분주하여 2 시간 동안  $25^\circ\text{C}$ 에서 정치시켰다. Blocking buffer와 PBS-T를 동량으로 섞은 희석 용액을 이용하여 혈청과 난황을 각각 2,000배 희석하고, 다시 3배수씩 단계 희석하였으며, 이를 각 well에  $100 \mu\text{L}$ 씩 분주한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 30 분간 반응시켰다. 2 차 항체로는 AP-conjugated rabbit anti-chicken IgY(Bethyl, USA)를 2,500 배로 희석하여 사용하였으며, 이를 각 well에  $100 \mu\text{L}$ 씩 분주 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 30 분 동안 반응시켰다. 이후 phosphate substrate tablets(*p*-nitrophenyl phosphate) (Sigma, USA)를  $0.5 \text{ mM MgCl}_2$ 가 함유된  $10\% \text{ diethanolamine}$ (pH 9.8) 용액에 용해시킨 기질을 plate에 가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 20 분간 발색 반응을 유도하였고, Microplate reader(Molecular Devices; E Max)를 사용하여  $405 \text{ nm}$ 에서 흡광도(optical density)를 측정하였으며, 이 결과를 이용하여 항체가를 산출하였다.

## 결 과

### 1. Fiber 2 유전자 확보 및 재조합 Fiber 2 단백질 발현벡터 구축

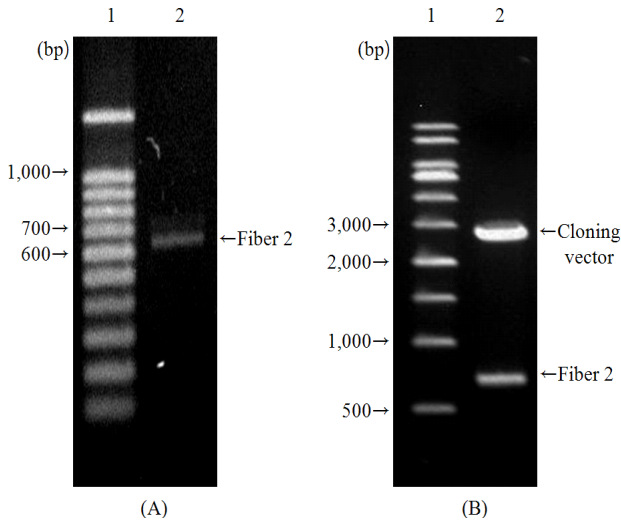
Fiber 2 유전자를 확보하기 위하여 PCR을 수행하여 목적으로 한 630 bp의 밴드를 얻었고(Fig. 1A), 이를 TA cloning vector에 클로닝한 다음, 제한 효소 분석을 통하여 목적인 유전자를 확인하였다(Fig. 1B). 또한 염기서열 분석을 통하여 Gen-Bank(NC001720)에 등록되어 있는 fiber 2 유전자 서열과 99 %의 homology를 확인하였으며, expression vector인 pET-21d(+)에 다시 클로닝하여 발현 벡터를 구축하였다.

### 2. 재조합 Fiber 2 단백질의 발현

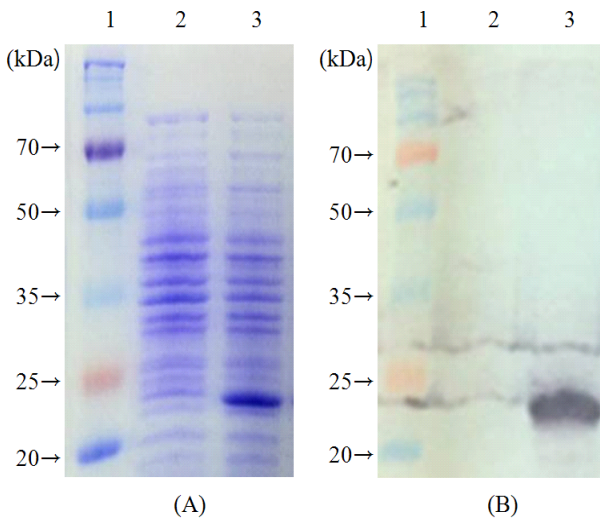
pET-21d(+) expression vector로 클로닝이 확인된 fiber 2 유전자의 단백질 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였으며(Fig. 2A), anti-His-Tag monoclonal antibody를 이용하여 Western blot analysis를 실시하였다(Fig. 2B). Fig. 2(A)에 나타낸 바와 같이, 재조합 fiber 2 유전자 발현을 유도한 *E. coli*에서 추출한 단백질에서 약 22 kDa 크기의 fiber 2 단백질을 확인할 수 있었다. 반면에 pET-21d(+) vector만을 이용하여 발현한 단백질의 경우, 어떤 밴드도 검출되지 않았다.

### 3. 산란계 혈청과 난황 내 재조합 Fiber 2에 대한 항체 역가의 변화

재조합 Fiber 2 단백질을 산란계에 3 주 간격으로 4 회 면



**Fig. 1.** Expression vector of fiber 2 gene of FAV.  
 (A) 1.5% agarose gel electrophoresis of PCR product. Lane 1 : 100 bp DNA marker; Lane 2 : PCR product of fiber 2 gene(630 bp).  
 (B) 1 % agarose gel electrophoresis of *Hind*III digested TA/fiber 2 cloning vector. Lane 1 : 1 kb DNA marker; Lane 2 : *Hind* III digested cloning vector and fiber 2 gene.



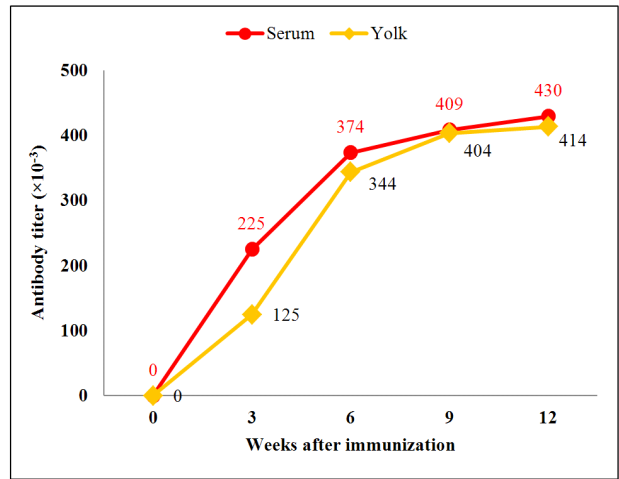
**Fig. 2.** Expression of recombinant FAV fiber 2 protein.  
 (A) 12.5% SDS-PAGE and (B) Western blot analysis with monoclonal rabbit anti-His-Tag antibody(1:2,000). Lane 1 : protein marker; Lane 2 : extracts from *E. coli* BL21(DE3) transformed with the pET-21d(+) plasmid; Lane 3 : extracts from *E. coli* BL21 (DE3) transformed with the pET-21d(+)/fiber 2.

역한 다음, 각 주차별로 혈청과 난황 내 재조합 fiber 2 단백질에 대한 항체 역가를 측정 한 결과, 접종 후 3 주부터 형성되기 시작하여 6 주경에 급격히 증가하였으며, 12 주까지 꾸준히 증가하였다.

혈청과 난황 내 항체 역가는 12 주경에 각각 430,000과 414,000의 최고치 수준을 보였다(Fig. 3).

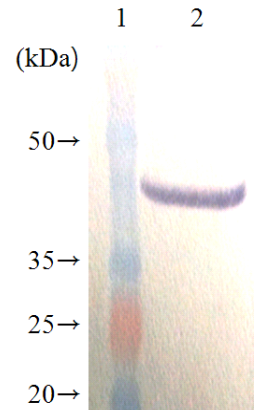
4. Anti-Fiber 2 IgY를 이용한 Fiber 2의 검출

재조합 fiber 2 단백질을 산란계에 면역하여 얻어진 난황 항체의 fiber 2 binding activity를 확인하기 위하여 난황 항체를 이용하여 Western blot analysis를 실시한 결과, 약 48 kDa 크기의 fiber 2 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 4).



**Fig. 3.** Developmental changes of serum and egg yolk antibody titer against recombinant FAV fiber 2 after immunization.

Boosters were given to layers 3, 6, 9 weeks after the first injection (0 week). Antibody titers from sera and egg yolk were determined by indirect ELISA every 3 weeks.



**Fig. 4.** Detection of FAV fiber 2 with anti-FAV fiber IgY derived from recombinant FAV fiber 2-immunized chicken. Lane 1 : protein marker; Lane 2 : the protein of FAV obtained from the CEL cells infected with the FAV.

## 고 찰

최근 각종 바이러스 감염의 진단 및 치료를 위한 난황 항체의 연구가 진행되고 있다(Shuizhong et al., 2012; Gholamreza et al., 2012; Ying et al., 2013). 본 연구에서는 가금 아데노바이러스의 fiber 2 유전자를 이용한 재조합 단백질을 생산하고, 산란계에 면역을 실시하여 FAV fiber 2에 특이적인 난황 항체를 생산하고자 하였다. 먼저 대장균 발현 시스템을 이용하여 발현된 재조합 단백질이 anti-His-Tag monoclonal antibody와 특이적으로 반응한다는 것을 Western blot analysis를 통하여 확인하였으며, 이는 대장균에서 유도되어 발현된 단백질이 재조합 fiber 2 단백질을 나타내었다.

상업적으로 판매되는 가금 아데노바이러스에 대한 세포주를 입수하기 어려운 관계로 Shuizhong 등(2012)의 방법을 수정 보완하여 가금 아데노바이러스의 fiber 2 중화 테스트를 수행하였다. El Bakkouri M 등(2008)에 의하면 Fiber 2 단백질은 head, shaft, tail로 구분되는데, 이 중 tail 부분이 아데노바이러스 수용체의 결합에 중요한 역할을 하는 AB loop와 유사한 형태인 AA' loop의 특이적인 형태를 지니며, 따라서 이 연구에서는 fiber 2의 tail(22 kDa) 부분을 사용하여 재조합 난황 항체를 생산하였다. 중화 테스트 결과에 나타난 48 kDa의 밴드는 fiber 2의 전체 크기를 나타내며, 이를 통해 재조합 fiber 2 단백질(22 kDa)을 산란계에 면역하여 얻어진 난황 항체가 가금 아데노바이러스 내 fiber 2 단백질 전체와 특이적으로 반응한다는 것이 확인되었다. 따라서 본 연구에서 생산된 재조합 fiber 2 단백질에 대한 특이 난황 항체를 이용할 경우, 가금 아데노바이러스의 성장과 전파에 중요한 역할을 하는 fiber 2를 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

기존 논문에 의하면, 항체 반응을 유도하기 위한 효율적인 농도의 범위는 10~1,000 µg이라고 보고된 바 있다(Erhard et al., 2000). 이에 의거하여 본 연구에서는 산란계에 재조합 fiber 2 항원을 총 3 가지 농도(수당 100 µg, 200 µg, 500 µg)로 접종하였으며, 그 결과, 500 µg의 농도가 가장 높은 항체 역가를 나타냈으며, 면역이 계속 진행됨에 따라 200 µg의 농도로 접종했을 때 나타난 항체 역가와 비슷한 수준을 유지하였다(data not shown). 따라서 앞으로 재조합 fiber 2 항원을 이용한 난황항체 생산 시 수당 200 µg의 농도가 가장 적합할 것으로 판단되었다.

산란계에 재조합 fiber 2 항원을 접종한 후, 혈청과 난황 내 항체 역가를 측정된 결과, 혈청 항체와 난황 항체와의

변화가 비슷한 양상을 보였으나, 면역 후 6 주경의 혈청 항체와 난황 항체의 증가율이 더 높게 나타났다. 이와 같은 현상은 면역 직후부터 3 주경까지 혈중에 형성된 항체가 6 주경에 난황으로 이전되어 축적됨으로써 나타나는 현상으로 추정된다(Bar-Joseph et al., 1980; Shimizu et al., 1988).

결론적으로 본 실험을 통하여 FAV fiber 2에 특이적인 난황항체를 생산하였으며, 이러한 특이적인 난황 항체는 가금 아데노바이러스 감염의 예방 및 치료에 활용 가능할 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 가금에서 호흡기 질환, 심낭수종, 봉입체 감염, 산란저하증 등을 유발하는 가금 아데노바이러스의 fiber 2 유전자에 대한 특이 난황 항체를 개발하고자 실험을 실시하였다. Fiber 2 유전자를 클로닝한 뒤, 대장균 발현 시스템을 이용하여 약 22 kDa의 재조합 fiber 2 단백질을 생산하였다. 이를 산란계에 3주 간격으로 총 4회 면역하여 혈청 및 난황 내 항체가를 측정된 결과, 면역 후 12주경에 항체가가 최고치에 달하였으며, 산란계로부터 획득한 난황 항체를 이용한 Western blot analysis 결과, 가금 아데노바이러스 내 fiber 2 단백질과 특이적으로 반응한다는 것을 규명하였다. 결론적으로, 가금 아데노바이러스 fiber 2에 특이적인 난황 항체 생산에 성공하였으며, 이러한 특이적인 난황 항체는 가금 아데노바이러스로 인한 질병의 예방 및 치료에 활용 가능할 것으로 사료된다.

## 사 사

이 연구는 2013년도 단국대학교 산학협력단 연구비의 지원으로 연구되었습니다.

## 인용문헌

- Adair BM, Fitzgerald SD 2008 Group 1 adenovirus infections. *Dis Poult* 12:260-186.
- Bar-Joseph Md, Malkinson M 1980 Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA): an comparison of two plant viruses. *J Virol Methods* 1:179.

- Bradley RR, Lynch DM, lampietro MJ, Borducchi EN, Marouch DH 2012 Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. *J Virol* 86(1):625-629.
- El Bakkouri M, Seiradake E, Cusack S, Ruigrok RW, Schoehn G 2008 Structure of the C-terminal head domain of the fowl adenovirus type 1 short fibre. *Virology* 378(1):169-176.
- Erhard MH, Ozpinar H, Bilal T, Abas I, Kutay C, Eseceli H, Stangassinger M 2000 The humoral immune response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages. *Altern Lab Anim* 29:699-705.
- Gholamreza N, Monireh J, Farzaneh A 2012 Generation of egg yolk antibodies in chicken (IgY) against influenza M2 (M2e) protein. In: International Conference on Chemical, Biological and Medical Sciences, Kuala Lumpur (Malaysia).
- He F, Kwang J 2013 Monoclonal antibody targeting neutralizing epitope on H5N1 influenza virus of clade 1 and 0 for specific H5 quantification. *Influenza Res Treat*. 2013: Article ID 360675, 1-6.
- Hess M, Cuzange A, Ruigrok RW, Chroboczek J, Jacrot B 1995 The avian adenovirus penton: two fibres and one base. *J Mol Biol* 252(4):379-385.
- Hoerr FJ 2010 Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis* 54(1):2-15.
- Kovacs-Nolan J, Mine Y 2004 Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnol* 18(1):39-62.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, Garcia D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP 2009 Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet Parasitol* 163(1-2):123-126.
- Li XY, Jin LJ, Uzonna JE, Li SY, Liu JJ, Li HQ, Lu YN, Zhen YH, Xu YP 2009 Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): *in vivo* evaluation in a pig model of enteric colibacillosis. *Vet Immunol Immunopathol* 129(1-2):132-136.
- Mathew AG, Rattanatabtimong S, Nyachoti CM, Fang L 2009 Effects of in-feed egg yolk antibodies on Salmonella shedding, bacterial antibiotic resistance, and health of pigs. *J Food Prot* 72(2):267-273.
- Mcferran JB 2000 Avian adenoviruses. *Rev Sci Tech* 19(2): 589-606.
- Nandi S, Ray JP, Sarkar P, Maiti NK 2000 Interaction of avian adenovirus with the immune system of poultry. *Indian J Anim Sci* 70:228-230.
- Pallister J, Wright PJ, Sheppard M 1996 A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses. *J Virol*. 70(8):5115-5122.
- Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S 1988 Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 54(5): 1360-1366.
- Shuizhong H, Xiaoying Z, Jinzi Z 2012 Production of egg yolk antibody (IgY) against recombinant canine parvovirus VP2 protein. *Acta Sci Vet* 40:1029.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Ying CD, Xu FZ, Ming T, Pengwei H, Wen L, Hao F, Weiming Z, Xi Z 2013 A dual chicken IgY against rotavirus and norovirus. *Antivir Res* 97:293-300.
- 김정우 김도균 김철 2000 장관독성 대장균 K99(F5)의 섬모 항원에 대한 특이 난황항체의 생산. *한국동물자원과학회지* 42:371-378.
- 이희수 김종만 우승룡 정병열 조윤상 유한상 윤용덕 허원 문영식 오진식 2004 난황면역제를 이용한 개 주요 소화기 및 호흡기질병의 방제에 관한 연구 II. 난황면역제의 실험동물과 개에 있어서의 질병방제 효과. *대한수의학회지* 44(3):415-420.

(접수: 2013. 12. 19, 수정: 2014. 1. 13, 채택: 2014. 2. 3)