doi:10.11751/ISSN.1002 – 1280.2022.02.07

维生素 C 碳点对 IgY 二级结构及提取效果的影响

郭培红[1],田丹阳[2],黄 健[2],孙丙耀[2],宋学宏[2*]

(1. 昆山贝瑞康生物科技有限公司,江苏昆山 215345;2. 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院,江苏苏州 215123)

[收稿日期] 2021 – 09 – 06 [文献标识码]A [文章编号]1002 – 1280 (2022) 02 – 0046 – 07 [中图分类号]S859.79

[摘 要] 首次将维生素 C 碳点应用于 IgY 的提取工艺中,探讨不同浓度的维生素 C 碳点对抗草鱼 IL – 1β IgY 二级结构及提取效果的影响。结果表明,添加终浓度6.25 mg · L^{-1}和 12.50 mg · L^{-1}的维生素 C 碳点,使得 IgY 二级结构中 α – 螺旋相对含量分别较对照组提高了 12.6% 和 5.8%,结构更稳定。添加维生素 C 碳点有助于卵黄中水溶性蛋白的提取并提高抗体效价,6.25 mg · L^{-1}组的提取效果最好。此外,添加维生素 C 碳点能有效抑制 IgY 提取液中细菌的生长,实现室温条件下提取 IgY。研究表明,在传统酸化水提取 IgY 的基础上添加维生素 C 碳点,可实现室温条件下规模化提取 IgY。

[关键词] 碳点;卵黄抗体;圆二色谱;二级结构;提取

Effects of Vitamin C Carbon Points on the Secondary Structure and Extraction Effect of IgY

GUO Pei – hong [1], TIAN Dan – yang [2], HUANG Jian [2], SUN Bing – yao [2], SONG Xue – hong [2*]

(1. *Kunshan Best – Care Biological Technology Co., Ltd., Kunshan* 215345, *China*;
2. *School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou*, 215123, *China*)

Corresponding author: SONG Xue – hong, E – mail: sorgxh@suda.edu.cn

Abstract: In this study, vitamin C carbon point (CDs) was applied to the extraction of IgY for the first time, and the effects of CDs with different concentrations (0.00, 6.25, 12.50 and 25.00 mg · L^{-1}) on the secondary structure and extraction effect of IgY were investigated. The results showed that: Compared with the control group, the relative content of α – helix in the IgY secondary structure increased 12.6% and 5.8% respectively, with the final concentration of 6.25 and 12.50 mg · L^{-1} of CDs, which means its structure is more stable. The addition of CDs was helpful to extract the water – soluble protein from yolk and conducive to increase the titer of antibody, in particular, the 6.25 mg · L^{-1} group had the best extraction effect. The addition of CDs can

基金项目: 国家自然科学基金项目(项目编号:K113401417);江苏省渔业科技类项目(项目编号:Y2018 – 19);山东省重大科技创新工程项目(项目编号:2018CXGC0103)

作者简介: 郭培红,硕士研究生,水产工程师,从事水生动物健康养殖方向研究。

通讯作者: 宋学宏。E – mail: songxh@suda.edu.cn

effectively inhibit the growth of bacteria in the IgY extraction, and realize the extract of IgY at room temperature. Adding CDs on the basis of traditional acidification water extraction IgY can realize large – scale extraction of IgY at room temperature.

Key words: carbon point; egg yolk immunoglobulin; circular dichroism chromatography; secondary structure; extraction

卵黄抗体又称卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin,IgY),是鸡血清 IgG 转移到卵黄中形成的特异性抗体。常见的 IgY 提取方法有冻融法、水稀释法、盐析法、有机溶剂沉淀法、天然胶法、去污剂提取法等[1-5],但这些方法存在工艺流程多、设备要求高、试剂用量大、化学物质残留、污染环境等弊端。

碳点(carbon dots)是一种近似球形的直径小于 10 nm 的零维半导体纳米晶体,是极少分子或者原子组成的纳米团簇,其表面存在羟基、羧基、羰基等多种含氧官能团[6-7],具有水溶性好、易功能化、低毒性和生物相容性强等特点,广泛应用于不同生物及医学领域[8-10]。碳点表面存在多种含氧官能团,这一特性能否促进卵黄中蛋白质聚合体的解聚或脂蛋白中脂肪的去除,从而提高 IgY 的提取效率,有待验证。旨在分析维生素 C 碳点对 IgY 提取效果的影响,从而为规模化提取 IgY 的可行性以及碳点的创新性应用提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　材料　抗草鱼 IL-1β 高免蛋:选择苏州市吴江区汾湖镇红兴禽蛋经营部 130 日龄健康产蛋鸡,按照既定流程免疫,收集高免蛋[11];维生素 C 碳点由苏州大学功能纳米与软物质研究院前期制备,实验室保存。

1.1.2　试剂及仪器　BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;HRP 标记羊抗鸡 IgY 抗体购自 Thermo Fisher 公司;邻苯二胺购自北京百灵威科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。CR22G 型高速冷冻离心机为日本日立公司产品,J-815 圆二色光谱仪为日本 Jasco 公司产品,酶标仪是美国 BioTek 公司产品,其他均为国产仪器。

1.2　方法

1.2.1　IgY 提取方法　常温下用自来水清洗抗草鱼 IL-1β 高免鸡蛋,接着用 0.25 mg·L^{-1}的二氧化氯水溶液浸泡消毒 5 min。用卵黄分离器获取卵黄,室温搅拌均匀得到混合卵黄液。将维生素 C 碳点溶入浓度为 0.12 mol·L^{-1}(pH 5.1)的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,获得浓度分别为 0.00、6.25、12.50 及 25.00 mg·L^{-1}的维生素 C 碳点溶液。取卵黄液,按照卵黄与缓冲液体积比分别为 1∶5、1∶7 和 1∶9的比例,加入含不同浓度维生素 C 碳点的乙酸-乙酸钠缓冲溶液,室温 100 r·min^{-1}混合 10 min,每组设置 5 个重复,其中 3 个室温下,另 2 个4 ℃下避光静置沉淀 15 h。最后,室温条件下 4000 r·min^{-1}离心 30 min 得上清,即为抗草鱼 IL-1β IgY 提取液,留样待测。同样方法制备普通鸡蛋 IgY 提取液。

1.2.2　IgY 二级结构的圆二色光谱分析　卵黄与缓冲液体积比为 1∶9 组的不同浓度维生素 C 碳点提取的 IgY 提取液,经定性滤纸过滤除脂,然后加入硫酸铵晶体,使其终浓度为 19%,室温静置 1 h 后,12000 r·min^{-1}低温离心 10 min,得白色沉淀。将白色沉淀溶解于原体积的 PBS(0.01 mol·L^{-1},pH 7.4)中,再加入硫酸铵晶体至终浓度 13%,室温静置 1 h 后 12000 r·min^{-1}低温离心 10 min,取其白色沉淀,溶于 PBS。4 ℃条件下,PBS 中搅拌透析 24 h,期间更换 4 次 PBS,最终得到纯化的抗草鱼IL-1β IgY。调整各组 IgY 终浓度至0.2 g·L^{-1},在 J-815 圆二色光谱仪上测定 IgY 二级结构。测定参数:石英样品池光径 1 mm,灵敏度 20 mdeg,扫描速度 100 nm·min^{-1},扫描范围190~250 nm,室温下进行测定。试验中以 PBS 缓冲液为空白扣除溶剂吸收峰,所有圆二色数据经 3 次扫描取平均

值,得圆二色谱图。所得圆二色数据经仪器自带分析软件,采用杨氏算法拟合并计算各二级结构相对比例。

1.2.3 IgY 提取液中蛋白含量的测定 采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 IgY 提取液中水溶性蛋白含量。

1.2.4 IgY 提取液中 IgY 量的直观测定 因 IgY 提取液中残存少量杂蛋白,为进一步直观检测不同浓度维生素 C 碳点对 IgY 提取效果的影响,将 IgY 提取液用定性滤纸过滤,用质量体积比为 19% 的硫酸铵晶体进行沉淀后,再用 IgY 提取液相同体积的 PBS 重悬,取 20 μL 重悬液上样进行 SDS – PAGE 电泳分析,鉴定 IgY 提取效果。

1.2.5 IgY 提取液中抗体效价的测定 IgY 提取液中抗体效价采用间接 ELISA 法测定:用碳酸盐缓冲液(0.05 mol · L^{-1},pH 9.6)稀释纯化的抗草鱼 IL – 1β 重组蛋白至 3 mg · L^{-1},包被 96 孔酶标板,37 ℃温育 1.5 h 后于 4 ℃过夜,10% 脱脂牛奶 37 ℃封闭处理 2 h;用抗体稀释液(含 1% 脱脂牛奶的 PBS)将 IgY 提取液按不同倍数稀释待检;二抗为羊抗鸡辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体(1∶2500 稀释);邻苯二胺为显色底物;2 mol · L^{-1}的 H_2SO_4 终止反应。用酶标仪在 492 nm 处读取 OD 值。以相同条件提取的普通鸡蛋的 IgY 作为阴性对照,抗体稀释液为空白对照。判定标准为:P/N =(待测 OD 值 – 空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值 – 空白对照 OD 值),当 P/N ≥ 2.1 时抗体最大稀释度即为抗体效价。

1.2.6 IgY 提取液中细菌含量测定 以 4 ℃条件下提取的 IgY 提取液为对照,用 LB 固体平板涂布,测定当卵黄与缓冲液体积比为 1∶9 时不同浓度的维生素 C 碳点处理的草鱼 IL – 1β IgY 提取液中总菌含量。为验证维生素 C 碳点的杀菌作用,并排除离心对 IgY 提取液中菌含量的影响,将 IgY 提取液与卵黄中原有脂肪沉淀混合后,分别取 100 μL 涂布,培养 24 h 后统计菌落数。

1.2.7 数据处理 试验结果表示为“平均值 ± 标准差”,采用 SPSS17.0 经 One – way NOVA 分析后进行 Duncan's 多重比较法分析试验数据的差异显著性,显著水平为 $P < 0.05$;用 OriginPro 9.0 软件和 Excel 2007 作图。

2 结果与分析

2.1 维生素 C 碳点对 IgY 二级结构的影响 蛋白质二级结构是蛋白质多肽链中有规则的重复的构象,其稳定性是通过肽链骨架上的羰基和酰胺基团之间形成的氢键维系,α – 螺旋存在很多氢键,是蛋白质中最常见、最典型、含量最丰富的二级结构元件[12]。α – 螺旋的圆二色谱在极值波长 191 nm 处呈正峰,在 207 ~ 210 nm 处及 221 ~ 222 nm 处呈负峰。不同浓度维生素 C 碳点提取的抗草鱼 IL – 1β IgY 的圆二色光谱分析结果见图 1。光谱结果经软件分析可知,抗草鱼 IL – 1β IgY 是一个典型的只具有 α – 螺旋和 β 转角的蛋白,其中 α – 螺旋相对含量 50% 以上,这与方希修等[13]的研究结果略有差异,可能跟不同仪器的灵敏度及计算方法不同有关。随着维生素 C 碳点的添加,IgY 二级结构中 α – 螺旋相对含量呈现先增加后减低的趋势,其中 6.25 及 12.50 mg · L^{-1}组的 α – 螺旋相对含量为 59.0% 和 55.5%,分别较对照组提高了 12.6% 和 5.8%,25.00 mg · L^{-1}组的 α – 螺旋相对含量与对照组完全一致,分别为 52.2% 和 52.4%。结果证明维生素 C 碳点有提高抗草鱼 IL – 1β IgY 结构稳定性的作用。

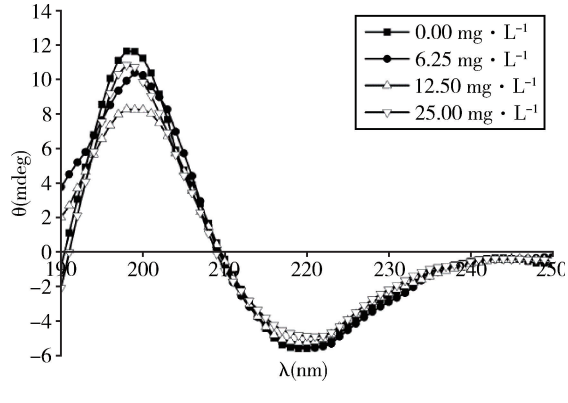


图 1 不同浓度维生素 C 碳点提取的抗草鱼 IL – 1β IgY 的圆二色光谱图谱

Fig 1 Circular dichroism spectra of anti – IL – 1β IgY of grass carp extracted from different concentrations of vitamin C carbon spots

2.2　维生素 C 碳点对高免蛋卵黄中水溶性蛋白的提取效果的影响　抗草鱼 IL－1β IgY 提取液中水溶性蛋白含量结果见表 1。由表 1 可知，缓冲溶液不同稀释比例组 IgY 提取液中水溶性蛋白浓度随维生素 C 碳点浓度的增加而提高。各组间综合比较，当维生素 C 碳点浓度为 25.00 mg · L^{-1}时，缓冲液比例为 1∶9 组的 IgY 提取效果最好，达到极显著性差异（$P<0.01$），其次是缓冲液比例为 1∶7 组（$P<0.05$）。缓冲溶液稀释比例越高，可溶性蛋白提取效果越好，添加维生素 C 碳点有助于卵黄中水溶性蛋白的提取。

表 1　不同浓度维生素 C 碳点及不同比例的缓冲液提取卵黄中水溶性蛋白的效率（mg · g^{-1}卵黄）

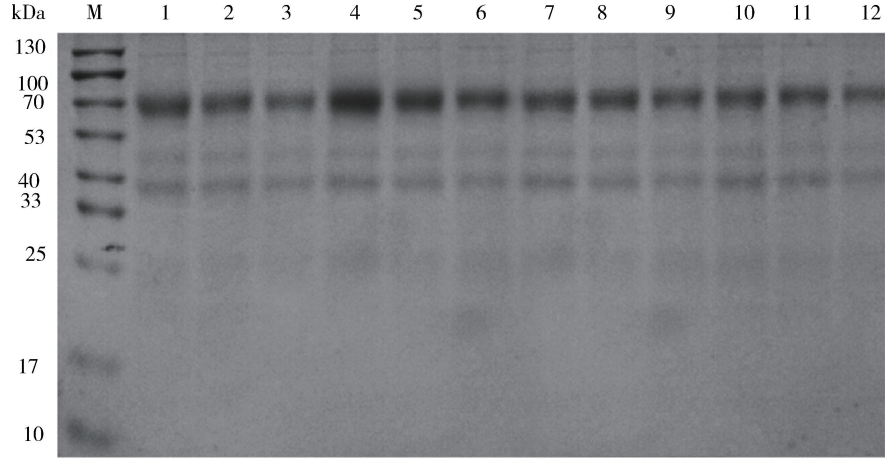
Tab 1　Extraction efficiency of water－soluble protein from yolk with different concentrations of Vitamin C carbonpoints and different proportions of buffer solution（mg. g－1 yolk）

维生素 C 碳点浓度（mg · L^{-1}）	卵黄与缓冲液比例		
	1∶5	1∶7	1∶9
0.00	73.2 ±7.7^{a}	77.8 ±7.2^{ab}	77.1 ±0.1^{ab}
6.25	74.1 ±7.5^{a}	78.9 ±5.6^{ab}	81.3 ±0.9^{ab}
12.50	77.6 ±7.4^{ab}	87.2 ±7.2^{bc}	85.5 ±3.0^{bc}
25.00	81.1 ±5.4^{ab}	91.9 ±1.9^{cd}	100.7 ±4.0^{d}

注：所有数据肩标字母不同者表示差异显著（$P<0.05$）。

2.3　维生素 C 碳点对 IgY 提取液中 IgY 量的直观影响　SDS－PAGE 电泳分析了维生素 C 碳点添加对 IgY 提取效果的影响，其结果如图 2。由图 2 可知，抗草鱼 IL－1β IgY SDS－PAGE 电泳图可观察到 66 kDa 左右的 IgY 重链、25 kDa 左右的 IgY 轻链，以及 40 kDa 上下的两条杂蛋白条带（可能是卵黄蛋白原Ⅱ前体的 C－末端片段[14]）。从纯度（即条带灰度）分析，相同缓冲溶液比例组，当维生素 C 碳点浓度为 6.25 mg · L^{-1}时抗体提取效果最好，其次为 12.50 mg · L^{-1}浓度组，其它组差异不明显；三个比例的缓冲液提取的 IgY 均能达到较高纯度，且差异不明显。此结果与卵黄抗体提取液中水溶性蛋白含量结果不一致，说明高浓度维生素 C 碳点在提取 IgY 的同时提高了部分非 IgY 的水溶性杂蛋白，低浓度维生素 C 碳点更有利于 IgY 的提取。

2.4　维生素 C 碳点对 IgY 提取液中抗体效价的影响　将室温条件下，同一缓冲溶液体积比的相同维生素 C 碳点浓度的三个重复 IgY 提取液合并后测其抗体效价，结果如图 3。由图 3 中 ELISA 结果可知，当卵黄与缓冲溶液比例为 1∶5 时，乙酸－乙酸钠缓冲溶液中添加维生素 C 碳点后各组 IgY 提取液中抗体效价均由对照组的1∶16000提高到了1∶32000；



注：M，蛋白分子量标准；泳道 1～3，维生素 C 碳点浓度为 0.00 mg · L^{-1}；泳道 4～6，维生素 C 碳点浓度为 6.25 mg · L^{-1}；泳道 7～9，维生素 C 碳点浓度为 12.50 mg · L^{-1}；泳道 10～12，维生素 C 碳点浓度为 25.00 mg · L^{-1}。泳道 1、4、7、10，卵黄与缓冲液质量体积比为 Ƃ；泳道 2、5、8、11，卵黄与缓冲液质量体积比为 1∶7；泳道 3、6、9、12，卵黄与缓冲液质量体积比为 1∶9。

图 2　SDS－PAGE 电泳鉴定维生素 C 碳点对 IgY 提取效果的影响

Fig 2　Effects of vitamin C carbon spots on IgY extraction were identified by SDS－PAGE electrophoresis

当卵黄与缓冲溶液比例为 1∶7 时,维生素 C 碳点浓度 6.25 及 12.50 mg·L^{-1}组的抗体效价由 1∶16000 提高到了 1∶32000,但维生素 C 碳点浓度 25.00 mg·L^{-1}组的抗体效价与未添加维生素 C 碳点组无差异;当卵黄与缓冲溶液比例为 1∶9 时,对照组抗体效价为 1∶8000,维生素 C 碳点浓度 25.00 mg·L^{-1}组的抗体效价为 1∶16000,而维生素 C 碳点浓度 6.25 及 12.50 mg·L^{-1}组的抗体效价达到了 1∶32000。此结果一方面说明维生素 C 碳点的添加有助于 IgY 的提取,另一方面说明低浓度维生素 C 碳点提取 IgY 的效果较好。

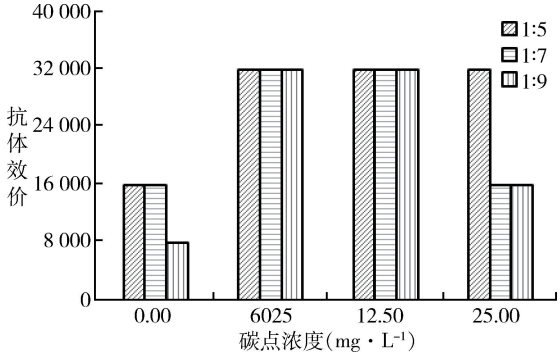


图 3　不同浓度维生素 C 碳点及不同比例缓冲液提取的卵黄抗体的抗体效价

Fig 3　Antibody titers of yolk antibody extracted from different concentrations of vitamin C carbon spots and different proportions of buffer solution

2.5　维生素 C 碳点对 IgY 提取液中细菌含量的影响　当卵黄与缓冲液体积比为 1∶9 时不同浓度的维生素 C 碳点对抗草鱼 IL－1β IgY 提取液中总菌含量的影,室温条件下,未添加维生素 C 碳点的缓冲液提取的 IgY 液中细菌量较低温条件菌含量高($P<0.05$);当缓冲液中加入维生素 C 碳点后 IgY 提取液中的细菌含量显著下降($P<0.05$),且菌落数随维生素 C 碳点浓度的提高而减少,直至完全抑制细菌生长。说明在添加一定浓度维生素 C 碳点的情况下,可以实现室温提取 IgY,且因维生素 C 碳点会降解而无毒,使得提取 IgY 后的副产品可进一步开发利用。

3　讨　论

IgY 稳定性好,可室温长期保存,能够有效通过动物口腔和食道,在肠道发挥作用,同时还可在消化酶作用下降解成易被肠道吸收的具有免疫活性的小肽(Fab),转运至血液黏附病原体,或与宿主血液中的球蛋白末端结合免遭机体破坏[15－16]。同时,IgY 不与哺乳动物及水产动物发生交叉血清学反应及补体系统反应、不结合类风湿因子或 Fc 受体等[17],使用更安全。IgY 产自鸡蛋,产量高且获取方便,此外,还具有营养全面、富含生物活性物质、诱食性强等优势[18－19]。因此,突破规模化提取的技术瓶颈将极大地推进 IgY 在水产养殖上的应用。

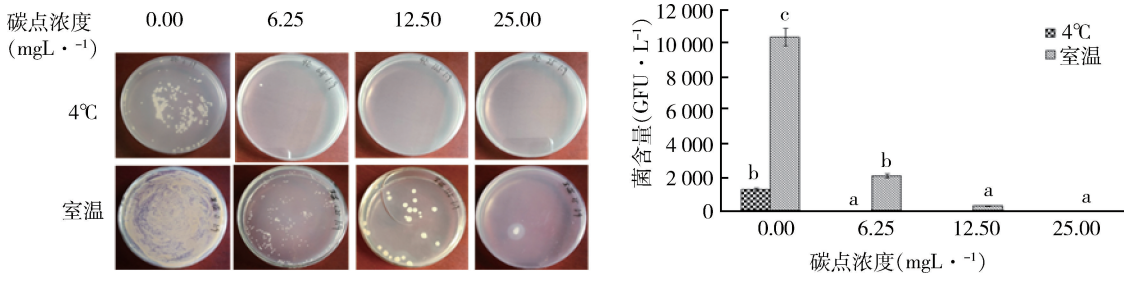


图 4　抗草鱼 IL－1β IgY 提取液中细菌含量测定

Fig 4　Determination of bacterial content in the extract of anti－IL－1β IgY of grass carp

酸化水提取 IgY 工艺简单,成本低廉,除脂效果好,但提取液中仍有脂类与蛋白质结合。研究首次将维生素 C 碳点应用于 IgY 的酸化水提取,分析了维生素 C 碳点对 IgY 提取效果及二级结构的影响,结果表明,添加维生素 C 碳点有助于卵黄中水溶性蛋白的提取和抗体效价的提高,且低浓度维生

素 C 碳点提取 IgY 的效果较好。圆二色光谱分析也表明,添加终浓度 6.25 和 12.50 mg · L^{-1}的维生素 C 碳点,使抗草鱼 IL-1β IgY 二级结构中 α-螺旋相对含量分别较对照组提高了 12.6% 和 5.8%,而 25.00 mg · L^{-1}组含量与对照组基本相同,出现这一结果,推测可能与维生素 C 碳点表面的羟基、羧基和氨基等官能团引起的极佳水溶性和化学反应性有关。这些官能团可与 IgY 结构中氨基酸残基相互作用,形成氢键或者范德华力等作用力[20],提高蛋白质的水溶性,IgY 构象发生变化,但同时这种作用力的形成具有竞争性,低浓度可以促进 α-螺旋的形成,提高 IgY 刚性,浓度过高则不利于氢键网络结构的形成;此外 IgY 构象的改变可能影响到了 IgY 的活性位点,导致高浓度维生素 C 碳点组的抗体效价不及低浓度组的高,具体机理有待进一步研究。维生素 C 碳点的添加能有效抑制 IgY 提取液中细菌的生长,实现室温条件下提取 IgY,其杀菌原理是维生素 C 碳点可以通过破坏细胞壁扩散进入细菌和真菌细胞内部,与细菌和真菌的 DNA 和 RNA 结合,抑制 rSNPs 基因表达,并最终杀死细菌和真菌[21]。

口服用 IgY 对纯度要求不高,本研究发现添加维生素 C 碳点后 1∶5 ~ 1∶9 比例的缓冲液提取 IgY 均可达到很好的效果且菌含量极低,所以可以根据实际应用情况确定缓冲溶液的比例。

4　结　论

与传统的酸化水提取方法相比,缓冲溶液中添加 6.25 mg · L^{-1}的维生素 C 碳点,一方面可以进一步提高 IgY 得率,所得 IgY 稳定性好,解决了现有技术中提取卵黄抗体方法中存在成本大、抗体损耗大的问题,另一方面,IgY 提取过程可在室温进行,设备要求简单,操作简便;同时解决了常规方法中提取液中残留的有机物及高剂量防腐剂对动物或人体存在潜在风险的技术问题;此外,因维生素 C 碳点具有良好的生物相容性,所以沉淀物还可开发为食品或饲料原料,或进一步用于卵黄高磷蛋白的提取[22]等,提高利用率,实现零污染。

参考文献:

[1] 张小莺, 陈 琛. 卵黄抗体技术[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 3-76.
Zhang X Y, Chen C. Egg yolk antibody technology[M]. Beijing: Science Press, 2011: 3-76.

[2] 李晓宇, 靖凯霖, 徐永平, 等. 一种适于大规模工业化生产的卵黄抗体提取方法[P]. 中国, 201510644260.7, 2015-09-30.
Li X Y, Jing K L, Xu Y P, et al. An extraction method for egg yolk antibody suitable for large-scale industrial production[P]. China, 201510644260.7, 2015-09-30.

[3] 王 耀, 刘文进. 一种卵黄抗体的脱脂方法[P]. 中国, 201811631680.1, 2018-12-28.
Wang Y, Liu W J. A method for defatting egg yolk antibody[P]. China, 201811631680.1, 2018-12-28.

[4] 向冬梅, 易思宇, 唐青海, 等. 卵黄抗体五种提取工艺比较及初步应用[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(15): 108-113.
Xiang D M, Yi S Y, Tang Q H, *et al*. Comparison and preliminary application of five extraction methods of egg yolk antibody[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(15): 108-113.

[5] 胡瑞鸿, 丛秋实, 李艳飞. 小鹅瘟卵黄抗体酸化水脱脂技术工艺优化[J]. 东北农业大学学报, 2018, 49(11): 18-25.
Hu R H, Cong Q S, Li Y F. Optimum procedure of degreasing condition by acidiied water in gosling yolk antibody[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2018, 49(11): 18-25.

[6] Li H, Kang Z, Liu Y, *et al*. Carbon nanodots: synthesis, properties and applications[J]. J Mater Chem, 2012, 22(46): 24230-24253.

[7] Zhang J, Yu S H. Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging[J]. Mater Today, 2016, 19(7): 382-393.

[8] 唐 琪, 王丹丹, 布文奂, 等. 维生素 C 碳点对口腔鳞状细胞癌 KB 细胞增殖、自噬和凋亡的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(4): 667-671.
Tang Q, Wang D D, Bu W H, *et al*. Influence of vitamin C carbon dots in proliferation, autophagy and apoptosis of oral squamous cell carcinoma KB cells[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2017, 43(4): 667-671.

[9] 王 琪, 王蓓蓓, 马美湖, 等. 荧光纳米材料应用于蛋白质分析的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 221-226.
Wang Q, Wang B B, Ma M H, et al. Recent Progress in Fluorescence Nanomaterial Application in the Field of Protein Analysis[J]. Food Science, 2015, 36(5): 221-226.

[10] 陶淞源, 朱守俊, 杨 柏. 新型碳基发光纳米材料 - CDs: 研究进展及展望[J]. 科学观察, 2019, 14(6): 35 - 37.
Tao S Y, Zhu S J, Yang B. A new kinds of Carbon - based Luminous Nanomaterials - Carbon Dots: Its Progresses and Prospects[J]. Science Focus, 2019, 14(6): 35 - 37.

[11] 宋学宏, 孙丙耀, 郭培红, 等. 一种抗鱼类 IL - 1β 卵黄抗体及其制备方法[P]. 中国, ZL201710530673.1, 2017 - 07 - 03.
Song X H, Sun B Y, Guo P H, *et al*. The egg yolk antibody against fish IL - 1β and its preparation [P]. China, ZL201710530673.1, 2017 - 07 - 03.

[12] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长发. 生物化学(上册)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005, 207 - 209.
Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry (Vol. 1) [M]. Beijing: Higher Education Press,2005, 207 - 209.

[13] 方希修, 方 圆, 王冬梅, 等. 重组酵母乙肝疫苗接种后鸡卵中抗乙肝 IgY 二级结构的圆二色谱分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(11): 1205 - 1210.
Fang X X, Fang Y, Wang D M, *et al*. Circular dichroism chromatography of secondarystructures of anti - HBV IgY in eggs from hens immunized with recombinant yeast HBV vaccine[J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2013, 29(11): 1205 - 1210.

[14] 张 曼, 柳 溪, 丛日华. 卵黄抗体提取方法的优化[J]. 天津农学院学报, 2020, 27(2): 56 - 60.
Zhang M, Liu X, Cong R H. Method optimization of IgY antibody extraction [J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2020, 27(2): 56 - 60.

[15] 巨晓军, 杨海明, 王志跃, 等. 卵黄免疫球蛋白在畜禽生产中的研究与应用[J]. 动物营养学报, 2015, 27(3): 691 - 697.
Ju X J, Yang H M, Wang Z Y, *et al*. Research and application of egg yolk immunoglobulin in animal production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(3): 691 - 697.

[16] Stadelman W J. The incredibly functional egg[J]. Poult Sci. 1999, 78(6): 807 - 811.

[17] 张 璐, 刘珍珍, 宁长申, 等. IgY 在免疫检测和治疗中的应用进展[J]. 动物医学进展, 2017, 38(1): 78 - 81.
Zhang L, Liu Z Z, Ning C S, *et al*. Advance in IgY application on immunodetection and disease treatment[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(1): 78 - 81.

[18] 刘建涛, 赵 利, 苏 伟. 鸡蛋中的生物活性蛋白质和肽[J]. 中国酿造, 2008, 24(201): 27 - 29.
Mine Y, Kovacs - Nolan J. Biologically active hen egg components in human health and disease[J]. J Poult Sci, 2004, 41: 1 - 29.

[19] Mine Y, Kovacs - Nolan J. Biologically active hen egg components in human health and disease[J]. J Poult Sci, 2004, 41: 1 - 29.

[20] 邹 华, 刘华荣, 梅 平. 碳点与人血清白蛋白的相互作用研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2017, 35(2): 101 - 107.
Zou H, Liu H R, Mei P. Interaction between Carbon quantum dots and human serum albumin[J]. Journal of Guangxi Normal University(Natural Science Edition), 2017, 35(2):101 - 107.

[21] Li H, Huang J, Song Y, *et al*. Degradable carbon dots with broad - spectrum antibacterial activity [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(32): 26936 - 26946.

[22] 张晓维. 卵黄高磷蛋白的分离纯化、结构表征及功能特性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2014.
Zhang X W. Preparation, structure characterization and function of phosvitin from hen egg yolk [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.

(编 辑:陈 希)