

[文章编号] 1671-587X(2024)02-0303-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240202

抗单纯疱疹病毒1型的IgY制备及其生物学活性检测

苏海涛¹, 翟玥², 宋秀玲², 徐坤^{2,3}

(1. 吉林省疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学公共卫生学院卫生检验教研室, 吉林 长春 130021; 3. 湖南师范大学医学院食品与营养卫生教研室, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的:** 制备抗单纯疱疹病毒1型(HSV-1)的卵黄抗体(IgY), 探讨该抗体的生物学活性, 阐明其抗HSV-1的能力。**方法:** 制备HSV-1灭活疫苗, 采用鸡胸多点注射法免疫高产蛋鸡, 采用聚乙二醇-6000(PEG-6000)法提纯IgY, 采用间接ELISA法、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术和蛋白浓度定量试剂盒测定IgY效价、纯度及蛋白水平, 采用间接ELISA法检测IgY中和病毒的能力, 测定病毒阻断率, 以Vero细胞为病毒感染靶细胞, 测定不同抗体浓度(0.015 60、0.031 25、0.062 50、0.125 00、0.500 00、和1.000 00 g·L⁻¹)作用后细胞病变效应(CPE), 根据CPE程度测定IgY体外抗HSV-1能力。**结果:** 制备的IgY效价随免疫时间逐渐升高, 达到1/1 024 000后保持稳定; IgY轻链重链条带清晰; IgY平均蛋白水平为11.544 g·L⁻¹; IgY对HSV-1的阻断率可高达77.90%; HSV-1致CPE程度随抗体浓度升高而逐渐降低, 当IgY浓度达到0.500 00 g·L⁻¹及以上时, 25%以下细胞(甚至无细胞)发生病变。**结论:** 成功制备出抗HSV-1的IgY, 该抗体对HSV-1具有明显的中和阻断能力和体外抑制活性, 可用于药物及诊断方法的开发。

[关键词] 单纯疱疹病毒1型; 卵黄抗体; 中和病毒; 体外抗病毒能力

[中图分类号] S852.43 **[文献标志码]** A

Preparation of IgY against herpes simplex virus-1 and detection of its biological activity

SU Haitao¹, ZHAI Yue², SONG Xiuling², XU Kun^{2,3}

(1. Institute of Parasitic Disease Prevention and Control, Center for Disease Control and Prevention of Jilin Province, Changchun 130062, China; 2. Department of Hygienic Inspection, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. Department of Food and Nutrition Hygiene, School of Medical Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT **Objective:** To prepare the anti-herpes simplex virus-1 (HSV-1) egg yolk antibody (IgY) and discuss its biological activity, and to clarify its anti-HSV-1 capability. **Methods:** The inactivated HSV-1 vaccine was prepared, the high egg-producing hens were immunized by multi-site injection method in the chicken breast, and IgY was purified by polyethylene glycol-6000 (PEG-6000) method; the titer, purity, and protein levels of IgY were detected by indirect ELISA method, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technology, and protein concentration quantification kits; the ability of IgY to neutralize the virus was detected by indirect ELISA method; the virus blocking rate was detected.

[收稿日期] 2023-04-27

[基金项目] 吉林省科技厅科技创新基地(平台)建设项目(YDZJ202302CXJD054)

[作者简介] 苏海涛(1980-), 男, 吉林省大安市人, 主任医师, 医学硕士, 主要从事传染病预防控制方面的研究。

[通信作者] 徐坤, 教授, 博士研究生导师(E-mail: xu_kun2022@163.com)

The Vero cells were used as the target cells for viral infection. The cytopathic effect (CPE) at different antibody concentrations (0.015 60, 0.031 25, 0.062 50, 0.125 00, 0.250 00, 0.500 00, and 1.000 00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was detected; the *in vitro* anti-HSV-1 capacity of IgY was detected according to the degrees of CPE. **Results:** The titer of the prepared IgY was gradually increased with the extension of immunization time. The titer of the IgY stabilized at 1/1 024 000; the clear bands for the IgY light and heavy chains were observed; the average protein level of IgY was 11.544 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; the blocking rate of IgY against HSV-1 could reach up to 77.90%; the degree of HSV-1 induced CPE was decreased with the increasing of the antibody concentrations, and when the concentration of IgY reached 0.500 00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or higher, less than 25% of the cells (even no cells) exhibited cytopathic changes. **Conclusion:** Anti-HSV-1 IgY is successfully prepared, and this antibody has significant neutralizing and blocking capabilities and *in vitro* inhibitory activity against HSV-1, which can be utilized for the development of drugs and diagnostic methods.

KEYWORDS Herpes simplex virus-1; Egg yolk antibody; Neutralizing virus; Antiviral ability *in vitro*

由于抗生素的发现和大量使用, 细菌感染性疾病已得到有效控制, 而病毒感染性疾病现已成为最主要的传染性疾病, 约占世界上传染性疾病病种的3/4以上^[1-2]。单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于 α 疱疹病毒亚科, 是一种在全球范围内广泛分布的病毒, 人类是其主要宿主^[3]。根据抗原性的不同, 可将其分为 HSV 1型 (HSV-1) 和 HSV 2型 (HSV-2)^[4]。HSV-1主要通过空气或口唇黏膜接触感染, 常引起口唇、咽、眼结膜和皮肤等感染, 感染人数可达人口总数的50%~90%^[5-6]。目前临床上主要应用核苷类药物治疗 HSV-1感染, 如阿昔洛韦、更昔洛韦和伐昔洛韦等^[7]。这些核苷类药物主要通过抑制 DNA 聚合酶的活性来抑制病毒的复制增殖, 进而达到控制感染进一步发展的目的^[8]。长期使用这些药物会引起一些不良反应, 如肝肾功能障碍、失眠、痤疮和耐药等^[9]。因此, 寻找毒副作用小、不耐药和治疗效果好的抗 HSV 药物十分必要^[10]。特异性抗体能够通过中和病毒, 调节免疫等机制, 实现被动免疫, 进而达到治疗或预防感染性疾病的目的, 可有效解决临床常用药物引起的耐药性, 在免疫治疗领域受到了广泛关注^[11-13], 而利用抗体治疗和预防 HSV-1感染相关的研究较少。卵黄抗体 (antibody of egg yolk, IgY) 是抗原免疫禽类后得到的卵黄中的特异性抗体, 其产量高, 易于纯化, 制备方便, 免疫原性强, 且不易与哺乳动物的免疫球蛋白发生交叉反应^[14-15]。本研究通过 HSV-1 灭活病毒免疫健康的高产蛋鸡, 收集鸡蛋并提取特异性 IgY, 检测其生物学活性, 从而制备出不同于传统作用机制的抗 HSV-1 病毒感染的替代品, 以减轻临床常用药物

引起的耐药性等不良反应^[16]。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、实验动物、主要试剂和仪器 非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 和 HSV-1 病毒由吉林大学公共卫生学院提供; 3只无特定病原蛋鸡购自山东昊泰实验动物繁育有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (鲁) -2018-0004。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、乳化剂 T-20 (Polyoxyethylene-20-Sorbitan Monolaurate, Tween-20) 和聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG-6000) 均购于美国 Sigma 公司, 细胞培养液 (RPMI-1640) 购于美国 Gibco 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购于天津康源生物科技有限公司, 胰蛋白酶购于天津灏洋生物公司, 蛋白浓度牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BCA) 测定试剂盒和预染蛋白质分子量标准均购于上海碧云天生物技术有限公司。动物隔离饲养箱 (型号: GJ-2) 购于苏州冯氏实验动物设备有限公司, 全波段酶标仪 (型号: Infinite M200 Pro) 购于美国 Biotech 公司, 低温高速离心机 (型号: Allegra X-30) 购自美国 Beckman 公司, 生物安全柜 (型号: MSC-Advantage 1.2) 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 紫外可见分光光度计 (型号: TU-1810DPC) 购于北京普析通用仪器有限责任公司, 垂直电泳仪 (型号: VE-180) 和多功能凝胶检测分析系统 (型号: TANON2500R) 购于上海天能科技有限公司, 漩涡混合仪购于海门市其林贝尔仪器有限公司, 倒置显微镜 (型号: DMI8) 购于德国徕卡仪器有限公司。

1.2 病毒培养及毒力测定 Vero 细胞置于含 10% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养形成单层细胞后, 接种适量病毒, 培养至细胞病变达 60% 左右时, 收获病毒, 离心后冻存, 且于使用前进行病毒毒力测定。将 Vero 细胞培养至对数生长期, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后, 制成单细胞悬液, 以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ L, 置于 37 °C、饱和湿度及 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h。待各孔内培养生长出单层贴壁 Vero 细胞后, 弃去细胞生长液。将 HSV-1 病毒原液用细胞维持液 (含 2% FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液) 按 10 倍递减进行稀释, 共 8 个稀释梯度, 每个浓度均设置 6 个复孔, 每孔加入病毒液 100 μ L, 同时设对照组, 对照组每孔加细胞维持液 100 μ L, 培养 1.5 h 后弃上清, 每孔加入细胞维持液 100 μ L 继续培养。每天在倒置显微镜下观察细胞的形态变化, 记录由病毒产生的细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE), 待细胞病变不再进展时停止观察。依据各稀释浓度出现病变细胞的百分率, 按照 Reed-Muench 法计算病毒细胞半数感染量 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀)。计算公式: $LgTCID_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 病变率的病毒最高稀释对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}$; 距离比例 = (高于或等于 50% 的病变率 - 50%) / (高于或等于 50% 病变率 - 低于 50% 的病变率)。

1.3 免疫蛋鸡 将 3 只健康的无特定病原高产蛋鸡饲养于隔离饲养箱 (温度 20 °C, 湿度 70%, 光照周期 12 h 光照/12 h 黑暗) 中, 水及饲料均经高压灭菌处理, 适应性喂养 1 周后免疫。免疫前于蛋鸡翅下取血, 离心分离的血清为阴性血清, 于 -20 °C 保存备用。疫苗制备步骤: 在 HSV-1 病毒液中加入 β -丙内酯 (0.1%), 混合振荡均匀, 于 4 °C 冰箱处理 24 h 以灭活病毒, 随后放置于 37 °C 水浴 2 h 以去除残留的 β -丙内酯; 将灭活后的病毒液 1 mL 分别与等体积的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂充分搅拌混匀至完全乳化, 于 4 °C 冰箱内保存 1 周, 至乳剂不分层; 采用鸡胸分点注射法免疫蛋鸡, 首次免疫每只鸡注射 1 mL 弗氏完全佐剂疫苗, 随后每间隔 2 周进行 1 次加强免疫, 每只鸡注射 1 mL 弗氏不完全佐剂疫苗, 共加强免疫 3 次; 每次免疫前, 于鸡翅静脉处采血分离血清, 用于监测血清中抗体的产生及效价变化; 收集免疫前后鸡蛋并

记录, 于 4 °C 保存备用。

1.4 IgY 的制备 IgY 的制备: 清洗并消毒鸡蛋后将其打破, 分离卵黄; 在 3 mL 卵黄中加入二倍体积 (6 mL) PBS 缓冲液, 再加入 PEG-6000, 使其终浓度质量体积比为 3.5%; 充分振荡混匀后, 静置 10 min, 于 4 °C 离心机中离心 20 min (10 000 r·min⁻¹) 后过滤; 滤液中加入 PEG-6000 (质量体积比 8.5%), 充分振荡混匀后, 离心 20 min (10 000 r·min⁻¹); 离心后弃上清, 沉淀中加入 10 mL PBS 缓冲液使其重悬, 再加入 1.2 g PEG-6000, 充分振荡混匀后, 离心 20 min (10 000 r·min⁻¹); 离心后弃上清, 在沉淀中加入 1 mL PBS 缓冲液使其重悬; 采用 0.1% 生理盐水和 PBS 缓冲液先后透析 10 和 4 h, 从而制备出 IgY。

1.5 IgY 效价、纯度和蛋白含量的检测 采用间接 ELISA 法测量 IgY 的效价: 抗原 (HSV-1) 用抗原包被液 (碳酸盐缓冲液, pH9.6) 1:20 稀释后, 抗原稀释液以每孔 100 μ L 包被于 96 孔 ELISA 板; PBST 洗板 3 次后, 进行封闭以保护包被于 ELISA 板的蛋白; PBST 洗板 3 次, 加入倍比稀释的待测 IgY 或血清, 每孔 100 μ L, 37 °C 孵育 120 min, 免疫前提取的抗体或血清作为阴性对照; PBST 洗板 3 次后, 每孔加入 100 μ L 羊抗鸡酶标二抗, 待二抗结合后, 每孔加入 50 μ L TMB 显色液, 避光放置 15 min 后, 每孔加入 50 μ L 终止液 (H₂SO₄, 2 mol·L⁻¹); 采用酶标仪于 450 nm 波长下检测吸光度 (A) 值, 以受检样本孔阳性 A 值/阴性 A 值 (positive/negative, P/N) ≥ 2.1 倍判为阳性, 待测血清或抗体的稀释度被认定为其效价。对该间接 ELISA 法分别从包被条件、封闭条件和二抗反应条件 3 个方面进行优化: 包被条件包括 4 °C 过夜, 37 °C 孵育 1 h 和 37 °C 孵育 2 h; 封闭条件包括封闭液 [1% BSA、1% 脱脂奶粉、5% 脱脂奶粉和 5% FBS] 和封闭时间 (1 和 2 h); 二抗反应条件包括二抗的稀释度 (1:5 000、1:10 000、1:15 000 和 1:20 000) 和二抗的孵育时间 (30、60、90 和 120 min); 根据 P/N 值选择本实验的最佳包被条件为 37 °C 孵育 1 h, 最佳封闭条件为 1% BSA 封闭 1 h, 二抗的最佳工作条件为 37 °C 孵育 30 min。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 法检测 IgY 的纯度, 具体操作步骤: 配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶, 加样后 80 V 电压

下电泳 20 min, 电压调整为 120 V 后继续至电泳结束; 胶片使用考马斯亮蓝染液 (0.25%) 染色 30 min, 弃去染色剂进行脱色, 直至条带清晰; 使用凝胶成像系统进行凝胶摄像及结果分析。采用蛋白浓度 BCA 测定试剂盒检测 IgY 的蛋白含量: 严格按照说明书进行操作, 于酶标仪 562 nm 波长处检测受检样本孔 A 值。以标准组的 A 值为纵坐标, 对应的蛋白浓度为横坐标, 绘制标准曲线; 再根据待测抗体的 A 值计算出 IgY 的蛋白含量。

1.6 IgY 对 HSV-1 病毒中和阻断能力的检测 采用间接 ELISA 法检测 IgY 对 HSV-1 的中和阻断能力: 将 IgY 进行 1/8 000、1/16 000、1/32 000、1/64 000、1/128 000、1/256 000、1/512 000 和 1/1 024 000 稀释, 将不同稀释倍数的 IgY 以每孔 100 μ L 加入 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度设置 3 个复孔, 同时设置阴性对照; 将 HSV-1 病毒原液灭活后 1:20 稀释, 以每孔 100 μ L 加入上述细胞培养板, 于 37 $^{\circ}$ C 中和反应 1 h; 采用酶标仪于 450 nm 波长下检测读取 A 值, 计算抗体对病毒的阻断率。阻断率 = (阻断前 A 值 - 阻断后 A 值) / 阻断前 A 值 \times 100%。

1.7 IgY 体外抗病毒能力的检测 预先准备长满单层 Vero 细胞的 96 孔细胞培养板, 吸弃培养液, 加入用生长维持液稀释的 HSV-1 病毒 (浓度为 $100 \times \text{TCID}_{50}$), 每孔 100 μ L, 置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 1 h。弃去病毒液, 用生长维持液洗 2 次。随后将不同浓度 IgY (0.015 60、0.031 25、0.062 50、0.125 00、0.500 00 和 1.000 00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 以每孔 100 μ L 加入细胞培养板内, 每个浓度设置 5 个复孔, 同时设置细胞阴性对照和病毒阳性对照。细胞培养板于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后, 观察并记录 CPE。根据加入不同浓度抗体后病毒引起的 CPE 程度, 评价 IgY 体外抗 HSV-1 病毒的能力, CPE 程度越低, 说明抗体体外抗病毒能力越高。根据观察不同浓度抗体加入后 CPE 的程度判断 IgY 的体外抗病毒能力, “-”表示细胞无病变; “+”表示 25% 以下的细胞发生病变; “++”表示 25%~50% 的细胞发生病变; “+++”表示 51%~75% 的细胞发生病变; “++++”表示 76%~100% 的细胞发生病变。

2 结果

2.1 HSV-1 病毒滴度的确定 倒置显微镜下观察结果显示: 正常的 Vero 细胞形态正常, 呈长梭形,

细胞膜界限清晰, 排列整齐, 而 HSV-1 所致的细胞病变表现为细胞圆缩、融合、脱落或碎裂, 甚至形成空斑。根据 Reed-Muench 法计算 HSV-1 的 TCID_{50} 为 $1 \times 10^{-7.54} / 0.1 \text{ mL}$, 见图 1, 即该病毒原液稀释 $10^{7.54}$ 倍后, 接种 100 μ L 可使 50% 的细胞发生病变, HSV-1 病毒原液稀释 105.54 倍后的病毒液 ($100 \times \text{TCID}_{50}$) 应用于后续实验。

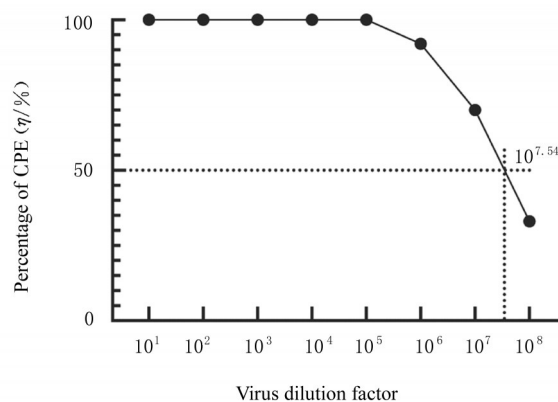
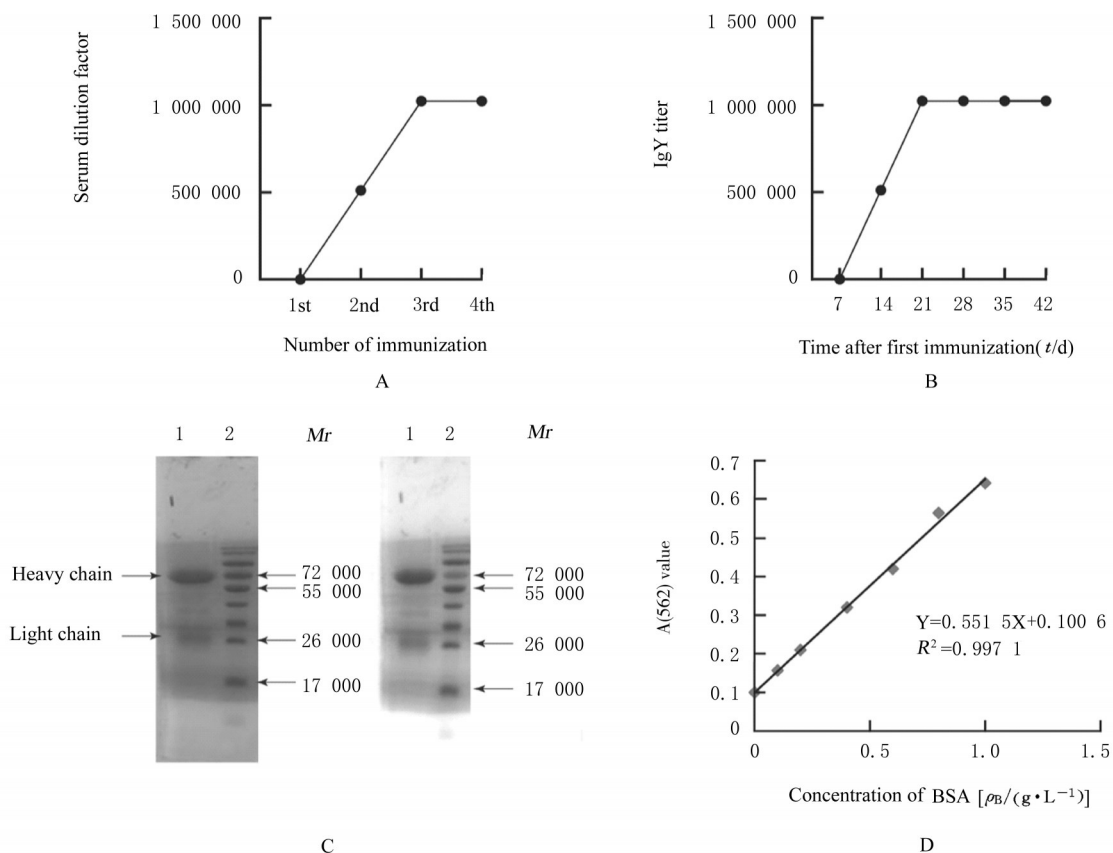


图 1 不同稀释度的 HSV-1 病毒所致的 Vero 细胞 CPE 百分率

Fig. 1 Percentages of CPE of Vero cells caused by HSV-1 virus with different dilutions

2.2 IgY 的效价、纯度和蛋白含量 首先采用优化的间接 ELISA 法检测蛋鸡免疫前后血清的效价, 首次免疫后到第 1 次加强免疫前, 蛋鸡血清内抗体的效价达到 1/512 000, 第 3 次免疫前, 血清内抗体的效价达到 1/1 024 000, 并保持稳定, 见图 2A。随后测定蛋鸡免疫前后提取的 IgY 的效价, 免疫 1 周后卵黄中就已产生 HSV-1 抗体, 随着免疫次数的增加, 鸡卵黄中的抗体效价于 7~21 d 内急剧升高, 效价达到 1/1 024 000, 随后保持稳定, 见图 2B。采用 SDS-PAGE 法鉴定 IgY 的纯度, 组成 IgY 的 2 条轻链和 2 条重链较为清晰, 说明本研究制备的 IgY 纯度较好, 见图 2C。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 IgY 的蛋白含量, 以 BSA 标准品浓度为横坐标, A 值为纵坐标, 标准曲线为 $Y = 0.551 5X + 0.100 6$, $R^2 = 0.997 1$, 见图 2D。将效价达到稳定后的 IgY 溶液合并, 根据标准曲线方程和 A 值, 计算得到 IgY 的蛋白含量为 $11.544 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 IgY 对 HSV-1 病毒中和阻断能力的检测结果 在抗体稀释度低于 1/128 000 时, 阳性抗体的阻断率均高于 70%, 表明本研究所制备的 IgY 可以



A: Assessment of titer of laying hens serum after immunization; B: Assessment of titer of IgY produced by hens after immunization; C: Assessment of purity of IgY (Lane 1: IgY; Lane 2: Molecular weight marker); D: Assessment of protein content of IgY.

图2 IgY的制备和评价

Fig. 2 Preparation and evaluation of IgY

与 HSV-1 特异性识别并发生中和反应。当抗体稀释度为 1: 64 000 时, 阳性抗体的阻断率为 77.90%, 而阴性抗体的阻断率为 5.79%, 该浓度下抗体的阻断效果最好。IgY 特异性中和阻断 HSV-1 病毒的效果见图 3。

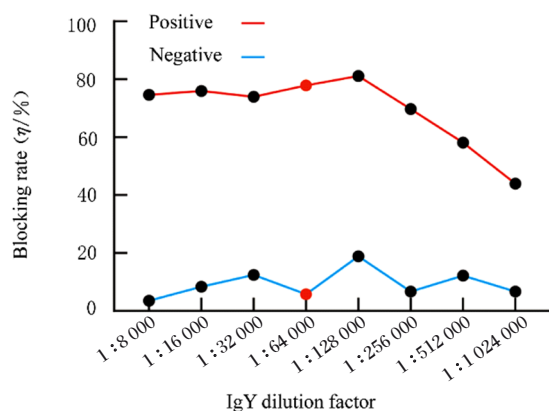


图3 IgY对HSV-1病毒的特异性阻断效果

Fig. 3 Specific blocking effect of IgY against HSV-1 virus

2.4 IgY 体外抗病毒能力 IgY 在 0.500 00 和 1.000 00 $g \cdot L^{-1}$ 浓度时, 对 HSV-1 病毒造成的 CPE 抑制作用较强, 几乎没有或很少细胞表现出 CPE; IgY 在浓度为 0.125 00 和 0.250 00 $g \cdot L^{-1}$ 时, IgY 也具有一定的细胞保护效果; IgY 在浓度低于 0.125 00 $g \cdot L^{-1}$ 时, 则不具备抑制 HSV-1 病毒对细胞毒性的能力。见表 1。

3 讨论

HSV-1 广泛存在于自然界, 主要引起眼部、口唇、皮肤黏膜和中枢神经系统的感染, 是人类最常见的病毒性疾病之一, 引起了研究者的广泛关注 [17]。目前临床上主要应用阿昔洛韦和更昔洛韦等核苷类药物治疗 HSV 感染, 这类药物对病毒感染的细胞具有较高的选择性, 但长期应用易引起肝肾功能障碍、失眠、痤疮和产生耐药株等不良反应 [18-19]。因此, 寻求不良反应少、治疗效果好的新型抗 HSV-1 药物十分迫切。利用抗体等免疫手段

表1 IgY体外抗HSV-1病毒的能力
Tab. 1 *In vitro* antiviral effect of IgY against HSV-1

Group	CPE
Virus	+++
Cell	-
Antibody(g·L ⁻¹)	
0.015 60	+++
0.031 25	+++
0.062 50	+++
0.125 00	+++
0.250 00	++
0.500 00	-/+
1.000 00	-/+

治疗或预防病毒感染是一种有效的方法,但特异性抗体抗HSV-1感染的相关研究较少。本课题旨在制备IgY,研究这一抗体药物对HSV-1的抗病毒效果。

本研究以HSV-1为抗原,制备灭活疫苗免疫蛋鸡。随着免疫次数的增加和免疫时间的延长,抗体效价明显升高,达到1:1 024 000较高的抗体效价后可保持稳定。IgY的重链和轻链条带明显可被观察到,说明本研究制备的IgY纯度较好,抗体平均蛋白水平为11.544 g·L⁻¹,为下一步检测其生物学活性提供了实验基础。此外IgY制备方法简单,成本低,可大量生产,满足开发新型抗体药物以治疗HSV-1的需求^[20]。

为了鉴定所制备抗体的生物活性,首先本研究采用特异性阻断实验测定抗体的中和反应能力,当抗体稀释度低于1/1 280 000时,对HSV-1的阻断率均高于70%,结果表明HSV-1可以与制备的IgY特异性识别并发生中和反应,为病毒检测和病毒预防奠定基础。随后采用细胞病变检测法检测IgY对HSV-1的体外抑制效果,结果表明:随着IgY浓度的升高,抑制CPE的能力升高,呈剂量依赖性。当抗体浓度高于0.125 00 g·L⁻¹时,IgY对HSV-1病毒具有明显的抑制作用。

综上所述,本研究成功制备出效价高和纯度好的抗HSV-1病毒的IgY,并验证了该IgY能够与HSV-1发生中和反应,具有阻断病毒感染和制备病毒诊断试剂的潜力,还证明了该IgY具有体外抗HSV-1病毒活性,IgY毒性小,不耐药,具有很好的新型药物开发前景。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

徐坤负责论文的整体设计,苏海涛、翟玥和宋秀玲负责论文的实验,苏海涛和翟玥负责论文撰写。

[参考文献]

- [1] 郭会芳,李卓荣.抗病毒药物的发展和研发策略[J].中国医药生物技术,2017,12(6):496-504.
- [2] 李耿,刘晓志,高健,等.新型抗生素的研发进展[J].中国抗生素杂志,2018,43(12):1463-1468.
- [3] 杨运森,周健伟,董志宁,等.单纯疱疹病毒IgM抗体(1+2型)时间分辨免疫荧光分析法的建立[J].热带医学杂志,2016,16(12):1483-1487.
- [4] CASTO A M, HUANG M W, XIE H, et al. Herpes simplex virus mistyping due to HSV-1×HSV-2 interspecies recombination in viral gene encoding glycoprotein B[J]. Viruses, 2020, 12(8): 860.
- [5] TONG L X, JACKSON J, KERSTETTER J, et al. Reactivation of herpes simplex virus infection in a patient undergoing ruxolitinib treatment [J]. J Am Acad Dermatol, 2014, 70(3): e59-e60.
- [6] 田文骏,郑成,王晓佳.单纯疱疹病毒I型最新研究进展——病原学、防控及应用[J].生命科学研究,2020,24(5):425-430.
- [7] HUA L Y, WAKIMOTO H. Oncolytic herpes simplex virus therapy for malignant glioma: current approaches to successful clinical application [J]. Expert Opin Biol Ther, 2019, 19(8): 845-854.
- [8] SADOWSKI L A, UPADHYAY R, GREELEY Z W, et al. Current drugs to treat infections with herpes simplex viruses-1 and -2 [J]. Viruses, 2021, 13(7): 1228.
- [9] AWAD S M, ALI S M, MANSOUR Y E, et al. Synthesis and evaluation of some uracil nucleosides as promising anti-herpes simplex virus 1 agents [J]. Molecules, 2021, 26(10): 2988.
- [10] ÁLVAREZ D M, CASTILLO E, DUARTE L F, et al. Current antivirals and novel botanical molecules interfering with herpes simplex virus infection [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 139.
- [11] JAHANGIRI A, OWLIA P, RASOOLI I, et al. Specific egg yolk immunoglobulin as a promising non-antibiotic biotherapeutic product against *Acinetobacter baumannii* pneumonia infection [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 1914.
- [12] ZHANG L H, XIAO Y R, JI L, et al. Potential therapeutic effects of egg yolk antibody (IgY) in

- Helicobacter pylori* infections — A review [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(46): 13691-13699.
- [13] 王芳, 张晓晓, 吴兴安. 治疗性抗体在病毒感染性疾病中的应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, (4): 557-560.
- [14] DE MEULENAER B, HUYGHEBAERT A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins; a review [J]. *Food Agric Immunol*, 2001, 13(4): 275-288.
- [15] BAO L R, ZHANG C, LYU J L, et al. Egg yolk immunoglobulin (IgY) targeting SARS-CoV-2 S1 as potential virus entry blocker [J]. *J Appl Microbiol*, 2022, 132(3): 2421-2430.
- [16] KOUJAH L, SURYAWANSHI R K, SHUKLA D. Pathological processes activated by herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in the cornea [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(3): 405-419.
- [17] LUCERO B D, GOMES C R, DE PP FRUGULHETTI I C, et al. Synthesis and anti-HSV-1 activity of quinolonic acyclovir analogues [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16(4): 1010-1013.
- [18] WANG Y, WANG Q, ZHU Q C, et al. Identification and characterization of acyclovir-resistant clinical HSV-1 isolates from children [J]. *J Clin Virol*, 2011, 52(2): 107-112.
- [19] SILVA M T LDA, DEODATO R M, VILLAR L M. Exploring the potential usefulness of IgY for antiviral therapy: a current review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 189: 785-791.
- [20] CHEN C J, HUDSON A F, JIA A S, et al. Affordable IgY-based antiviral prophylaxis for resource-limited settings to address epidemic and pandemic risks [J]. *J Glob Health*, 2022, 12:05009.