

抗鳃利斯顿氏菌鸡卵黄抗体制备及其活性研究

周永强, 李登峰*, 刘联国, 郭安南, 陈 炯, 王重彬

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)是常见的水产动物致病菌。为获得高效抗 *L. anguillarum* 卵黄抗体(egg yolk antibodies, IgY), 用纯培养的 *L. anguillarum* 制备抗原, 免疫蛋鸡, 联用乙酸-乙酸钠稀释、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 与 Na_2SO_4 盐析、透析法由蛋黄分离纯化 IgY。对制备的 IgY 进行了体内、外抑菌与吞噬调理活性研究: 分别将抗 *L. anguillarum* 的 IgY、由普通鸡蛋 IgY 与 *L. anguillarum* ($10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)等体积混合后注射克氏原螯虾(*Procambarus clarkia*), 计算成活率; 分别将抗 *L. anguillarum* 的 IgY、普通鸡蛋 IgY 与 *L. anguillarum* ($10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)及血细胞混合后, 接种平板培养、计数。结果表明, 提取的 IgY 浓度为 $8.93 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每个鸡蛋可获得 IgY 约 120 mg, 抗体纯度较高, 效价为 1:20480; 体外抑菌率为 65%; 能促进细胞吞噬 *L. anguillarum*, 相对吞噬率为 75%; 对克氏原螯虾的保护率为 33.3%。

关键词: 鳃利斯顿氏菌; 卵黄抗体; 制备; 抑菌活性; 吞噬调理

中图分类号: S948

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2012) 04-0001-05

鳃利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)可感染淡、海水鱼、虾、蟹、贝等, 其引起的疾病在世界范围内流行, 造成了巨大的经济损失^[1-4]。随着水产养殖业的不断发展, 水体生态环境恶化和养殖规模、密度不断提高, 病害频发, 越来越多的养殖户进入了“抗生素怪圈”, 即大量使用抗生素。这不仅诱发耐药性和机体应激, 亦破坏生态平衡, 反过来又成为疾病发生的诱因, 实为因治病而致病。此外, 抗生素、化学药物的滥用还存在药物残留, 危害产品的食用安全性, 污染环境等问题。针对细菌性疾病研发抗生素替代品势在必行, 并已成为当前研究的热点。禽卵黄抗体(Immunoglobulin of Yolk, IgY)是抗生素的最佳替代品。

自 1893 年 Klemperer 首次报道鸡蛋中存在卵黄抗体以来, IgY 的研究不断深入。IgY 作为防治药物和诊断试剂的研究和应用愈来愈受到关注^[5-13]。IgY 可用于治疗由细菌、病毒、寄生虫等病原体引起的疾病, 具有安全高效、无残留、不产生抗药性,

服用简便等优点。针对 IgY 专一性强的特点, 可以制备不同病原的 IgY, 对症下药, 达到全面防治的效果。IgY 在许多疾病, 尤其是烈性、急性、危害性较大疫病(包括新城疫、传染性法氏囊病、小鹅瘟、鸭病毒性肝炎及脑脊髓炎、犬瘟热、猪瘟、泌乳期牛的乳房炎、牛腹泻、产肠毒素性大肠杆菌引起的仔猪腹泻等)的防治上已有成功的尝试^[14-19]。并有多人、畜用 IgY 制剂获得批准进入市场。水产养殖动物病原卵黄抗体研究相对落后, 报道较少。笔者以灭活的鳃利斯顿氏菌纯培养物作为抗原, 制备抗鳃利斯顿氏菌 IgY, 探讨其抑菌、吞噬调理效果, 以期鳃利斯顿氏菌病害的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鳃利斯顿氏菌菌种: 由香鱼(*Plecoglossus altivelis*)中分离、纯化、鉴定后超低温冰箱保存; 海兰白蛋鸡(hyline white laying hens): 购于宁波益大

收稿日期: 2012-06-06

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2011C32004); 宁波市农业攻关项目(2011C10004); 宁波大学人才工程项目(XR0713017); 宁波市海洋蟹类产业科技创新团队项目(2011B81003); 宁波大学王宽诚幸福基金。

第一作者: 周永强(1987-), 男, 四川安岳人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: 317568882@qq.com

*通讯作者: 李登峰(1963-), 女, 湖南双峰人, 副教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: lidengfeng@nbu.edu.cn

养殖场; 克氏原螯虾(*P. clarkia*): 购于宁波大学菜市场, 体长 8~10 cm, 健壮、附肢完整, 实验室暂养 1~2 d 后, 投入试验; 血细胞: 用一次性无菌注射器抽取健康鸡血若干(1~2 mL), 加入肝素抗凝, 离心, PBS 清洗后, 用生理盐水悬浮. 实验前立刻配制使用以防止失活; 辣根过氧化酶标记羊抗鸡抗体: 购于北京博奥森生物公司; LB 培养基自配: 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 17 g, 加双蒸水至 1 000 mL, 调 pH 至 7.2; 乙酸-乙酸钠(pH 5.0): 2.86 mL 乙酸, 2.324 g 乙酸钠, 加双蒸水至 1 000 mL, 用 20%NaOH 调 pH 至 5.0; ELISA 试剂: ELISA 包被缓冲液: 0.05 mol·L⁻¹ pH 9.6; 碳酸盐缓冲液(CBS): Na₂CO₃ 1.59 g, NaHCO₃ 2.39 g 定容至 1 000 mL; 洗涤液(pH 7.4 PBST): NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, KH₂PO₄ 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, Tween-20 50 μL, 定容至 1 000 mL; 封闭液: 1.0 g 牛血清白蛋白加 100 mL 洗涤液; 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(pH 5.0): 柠檬酸 19.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 71.2 g, 定容 1 000 mL; 底物溶液: 40 mg 邻苯二胺(OPD)溶于 100 mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液, 用时加 30% H₂O₂ 150 μL; 终止液: 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液.

1.2 实验方法

1.2.1 蛋鸡免疫

取鳃利斯顿氏菌菌种进行活化培养, 稀释平板法计数, 0.9%生理盐水洗涤 3 次, 调整浓度为 2×10^9 CFU·mL⁻¹. 加入终浓度 0.5%的甲醛, 混匀后于 37℃恒温水浴灭活 24 h, 经检验无活菌后按体积比 1:1 加入弗氏佐剂, 振荡乳化后对 SPF 海兰白蛋鸡免疫, 免疫分 3 次, 首次用弗氏完全佐剂, 后两次用弗氏不完全佐剂, 每次间隔 15 d, 第 3 次免疫后 10 d 开始收集鸡蛋, 置 4℃冰箱保存待用.

1.2.2 卵黄抗体的分离纯化

取高免鸡蛋, 用酒精擦拭蛋壳, 吸取卵黄液, 加 10 倍体积乙酸-乙酸钠(pH 5.0), 充分混匀. 4℃静置 10 h 后, 10 000 g, 离心 20 min. 向上清中加入饱和(NH₄)₂SO₄使其终浓度为 40%, 4℃静置 10 h 后, 10 000 g, 离心 20 min. 沉淀用 140 g·L⁻¹ Na₂SO₄ 稀释至 100 mL, 4℃静置 10 h, 10 000 g 离心 20 min, 沉淀用 0.01 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.2)重悬, 经透析袋(截留量 100 kD)透析除盐. 另取非免鸡蛋同法提取卵黄抗体蛋白, 作为后续试验的对照样品.

1.2.3 卵黄抗体蛋白浓度测定及纯化效果检测

以 0.01 mol·L⁻¹ PBS 调零, 取适量透析产物 10 倍稀释, 核酸蛋白定量测定仪测定吸光度, 按如下公式计算浓度:

$$\text{蛋白含量}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = (1.45 \times \text{OD}_{280} - 0.74 \times \text{OD}_{260}) \times \text{样品稀释度}.$$

取 20 μL 透析后蛋白液, 1:1 加入 2×Loading Buffer, 100℃煮沸 10 min, 置冰上冷却后取 30 μL 上样. 跑 SDS-PAGE: 5%浓缩胶, 电压 100 V, 12%分离胶, 120 V. 考马斯亮蓝 G-250 染色、脱色液脱色, UVP 凝胶成像系统拍照并根据条带分析纯度.

1.2.4 抗体效价检测

实验采用改良间接 ELISA 法进行卵黄抗体效价检测. 包被: 用包被液(pH 9.6)稀释抗原至 10^9 CFU·mL⁻¹, 每孔 100 μL 加于 96 孔 ELISA 中, 4℃放置过夜. 次日倾去孔内液体, 洗涤液洗 3 次. 封闭: 每孔加入 100 μL 封闭液(含 1% BSA), 室温放置 0.5 h. 液洗 3 次. 添加一抗: 将 IgY 用 PBS 按 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120, 1:10240 倍比稀释, 分别加入反应孔中, 每个稀释度 2 孔, 每孔 100 μL. 设非免鸡蛋的 IgY 为阴性对照, PBS 为空白对照. 37℃温育 1 h. 洗涤液洗 3 次. 加入酶标二抗: 用封闭液 1:10000 稀释羊抗鸡 IgG-HRP, 每孔加入 100 μL, 37℃温育 1 h. 洗涤液洗 5 次. 显色: 每孔加入 OPD 底物溶液 100 μL, 37℃显色 15 min, 显棕黄色, 每孔加 50 μL 终止液终止反应, 酶标仪读取波长 492 nm 的吸光度(A)值. 结果判断: 测定孔 A 值>阴性对照孔均值 2.1 倍以上者判为阳性. 阳性反应的最大稀释度即为待测样品效价.

1.2.5 体外抑菌实验

取 2 只试管按表 1 加样, 混匀后, 取 100 μL 混合液于固体培养基涂匀, 28℃培养 24 h, 菌落计数, 对比、分析各组结果. 相对抑菌率(%)=(阴性组菌落数-阳性组菌落数)/阴性组菌落数×100%.

表 1 体外抑菌实验处理

组份	抗鳃利斯顿氏菌 IgY/mL	普通鸡蛋 IgY/mL	2×10^3 CFU·mL ⁻¹ 鳃利斯顿氏菌悬液/mL
阳性组	1	—	1
阴性组	—	1	1

1.2.6 吞噬调理实验

取 10^6 CFU·mL⁻¹ 鳃利斯顿氏菌液、抗菌 IgY、

血液以 1:1:1 等体积混匀, 室温、轻摇孵育 15~30 min, 取 100 μ L 混合液涂 LB 平板, 并设普通鸡蛋 IgY 为对照组. 28 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 观察计数, 分析吞噬情况. 相对吞噬率(%)=(阴性组菌落数-阳性组菌落数)/阴性组菌落数 $\times$ 100%.

1.2.7 动物保护实验

取 3 只试管按表 2 加样, 混匀备用.

表 2 体内抑菌实验处理

组份	抗鳗利斯顿氏菌 IgY/mL	普通鸡蛋 IgY/ mL	1×10^8 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 鳗利斯顿氏菌悬液/mL	PBS 缓冲液/ mL
阳性组	1	—	1	—
阴性组	—	1	1	—
空白组	—	—	1	1

取实验室暂养 1 周的克氏原螯虾 27 尾, 随机分为 3 组, I 组注射阳性组混合液, II 组注射阴性组混合液, III 组注射空白组混合液. 于虾的第 3 腹节浅层肌肉处注射感染, 注射量每尾 0.2 mL. 观察记录 1 周内死亡情况, 并按以下公式计算保护率:

保护率(%)=(存活尾数/受试尾数) $\times$ 100%.

2 结果

2.1 蛋白含量及效价测定

提取的 IgY 浓度为 8.93 mg $\cdot$ mL $^{-1}$, 每个鸡蛋 IgY 含量约为 120 mg, 与文献[14]每只鸡蛋约含 IgY100~150 mg 相符. 经间接 ELISA 测得 IgY 的效价为 1:10240.

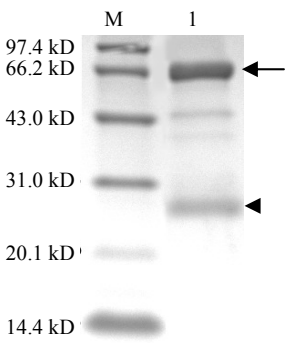
2.2 蛋白纯度检测

经过 SDS-PAGE 电泳, 可以获得抗鳗利斯顿氏菌卵黄抗体纯化效果图(图 1). 从图 1 可以发现, 在 66 kD 和 26 kD 附近有 2 条明显的色带, 分别为 IgY 的重链和轻链.

2.3 体外抑菌及调理吞噬实验效果

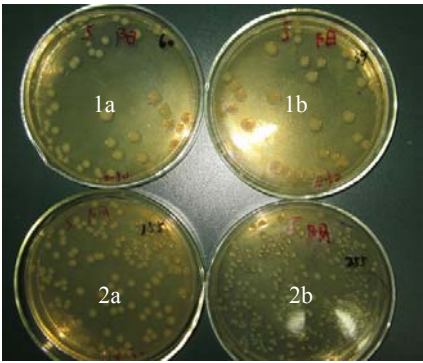
体外抑菌试验中, 培养 24 h 后, 阳性组菌落数量明显较阴性组少, 抗鳗利斯顿氏菌 IgY 与较普通鸡蛋提取的 IgY 能明显抑制鳗利斯顿氏菌的生长、繁殖, 相对抑菌率为 65%.

调理吞噬试验中, 培养 48 h 后, 阴性组的菌落数量明显多于阳性组(图 2), 与普通 IgY 相比, 制备的抗 *L. anguillarum* IgY 能促进血细胞对该菌的吞噬, 相对吞噬率为 75%.



泳道 M: marker; 泳道 1: 纯化的 IgY 重链(长箭头)和轻链(短箭头)

图 1 分离纯化 IgY 的 SDS-PAGE 图



1a 为抗鳗利斯顿氏菌 IgY+鳗利斯顿氏菌; 2a 为普通鸡蛋提取的 IgY+鳗利斯顿氏菌; 1b 同 1a, 2b 同 2a

图 2 调理吞噬效果

2.4 动物保护实验

由表 3 知, 只注射 *L. anguillarum* 的空白对照组和注射普通 IgY 与 *L. anguillarum* 混合液的阴性对照组的克氏原螯虾在 2 d 内全部死亡, 而同期注射含特异 IgY 的阳性对照组存活率为 66.7%, 阳性组的螯虾死亡集中发生在注射后第 3 天, 此后不再死亡, 最终存活率为 33.3%, 即保护率为 33.3%.

表 3 注射鳗利斯顿氏菌卵黄抗体对克氏原螯虾的免疫保护作用(注射后 2 d)

组别	数量/尾	死亡数/尾	保护率/%
I	9	3	66.7
II	9	9	0
III	9	9	0

表 4 注射鳗利斯顿氏菌卵黄抗体对克氏原螯虾的免疫保护作用(注射后 7 d)

组别	数量/尾	死亡数/尾	保护率/%
I	9	6	33.3
II	9	9	0
III	9	9	0

3 讨论

禽类的免疫系统主要包括细胞免疫和体液免疫,分别受胸腺和法氏囊的控制。当机体受到外来抗原刺激后,产生一系列免疫应答反应,大量特异性抗体进入血液循环,当血液流经卵巢时,特异性抗体(主要为IgG)在卵细胞中逐渐蓄积,形成卵黄抗体^[16],通常每只鸡蛋约含卵黄抗体 100~150 mg^[14]。笔者利用纯培养的鳃利斯顿氏菌抗原免疫母鸡,经1次基础免疫,2次加强免疫后,可由每个鸡蛋获得120 mg IgY,符合卵黄抗体廉价、高产的特点。

卵黄中的主要成分为蛋白质和脂肪,其比例为1:2^[17]。因此IgY的分离纯化首先需有效地去除卵黄中的脂类,从水溶性蛋白中分离IgY。目前已报道的纯化方法有盐析、乙醇和聚乙二醇沉淀法、疏水层析法、辛酸沉淀法(CA法)等^[20-21]。采用单一方法往往是不够的,常需多种方法综合应用。本实验先以乙酸-乙酸钠缓冲液对卵黄液进行稀释,离心去除卵黄颗粒,先后用硫酸铵和硫酸钠沉淀,根据蛋白质分子大小不同进行透析,除去大部分脂肪和杂蛋白。纯化的IgY经SDS-PAGE验证,目的条带明显,杂质少,纯度较高,比大部分文献报道的稍好。该方法操作简便、廉价,非常适合卵黄抗体的大量纯化。

本实验体外抑菌结果表明,抗鳃利斯顿氏菌IgY能抑制其生长和繁殖,相对抑菌率达65%。并能促进血细胞对其吞噬,相对吞噬率达75%。体内高剂量鳃利斯顿氏菌攻毒试验中,空白对照组和阴性对照组的克氏原螯虾在2d内全部死亡,而同期添加了抗鳃利斯顿氏菌IgY的阳性组存活率为66.7%,阳性组的克氏原螯虾死亡集中发生在注射后第3天,注射7d后阳性组的存活率为33.3%,此后不再死亡,即最终保护率为33.3%。说明抗鳃利斯顿氏菌卵黄抗体能延长鳃利斯顿氏菌浸染后克氏原螯虾的存活时间,并降低克氏原螯虾的死亡率。毛宁等^[22]用抗嗜水气单胞菌IgY注射治疗发生暴发性死亡的养殖场病蟹,治愈率约37.1%。李肖梁等^[23]将制备的抗嗜水气单胞菌IgY添加进饲料投喂甲鱼,再进行嗜水气单胞菌人工注射感染,保护效果显著,达83.3%。本实验的保护率和毛宁的结果相近,而与李肖梁的保护率相差甚远,究其

原因可能有:本试验采用了高剂量攻毒,而自然状态下很难有如此大菌量直接进入机体,估计自然状态下保护率应该明显高于本结果;给药的时间点不同,本实验与毛宁的实验是感染时或感染后进行治疗式给药,IgY来不及完全中和病原,导致受试动物不能完全受到保护而死亡,而李肖梁的研究则进行预防性给药,当血液中IgY达到一定浓度水平后才进行攻毒,病原与IgY能更好地结合,呈现出较高的保护率,最佳给药时间点有待于进一步研究;本实验与毛宁的研究均采用注射给药,这可能使机体产生了较强烈应激,IgY可能更适于口服给药。IgY有较强的耐热、耐酸、抗离子强度和一定的抗酶降解能力,在肠道中被消化后仍可降解成可结合片段,经肠道吸收后进入血液与特定的病原菌黏附因子结合,使细菌失去致病性,非常适合口服^[24]。因此,在后续工作中课题组将研究抗鳃利斯顿氏菌IgY作为饲料添加剂口服,用于病害预防与治疗的效果。

参考文献:

- [1] 张新中,张世秀,李海平,等.海水养殖动物致病性(Pathogenicity)鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)的研究综述[J].现代渔业信息,2007,22(1):16-18,22.
- [2] 苏永腾,刘波,周群兰,等.大黄葱醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究[J].水产学报,2008(3):455-462.
- [3] Devesa S, Toranzo A E, Barja J I. First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in North-western Spain[J]. Fish and Shellfish Pathology, 1985(1): 131-140.
- [4] 夏永娟,黄威权,姜国良.鳃弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察[J].海洋科学,2000,24(10):41-44.
- [5] Zhen Y H, Jin L J, Guo J, et al. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 130:126-133.
- [6] Fu C Y, Huang He, Wang X M, et al. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 133:112-115.
- [7] Sunwoo H H, Wang W W, Sim J S. Detection of *Escherichia coli* O157 H7 using chicken immunoglobulin Y[J]. Immunology Letters, 2006(106):191-193.
- [8] Xu Y P, Jin L J, Li X Y, et al. Application of chicken egg

- yolk immunoglobulin in land and aquatic animal diseases control[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136:9-10.
- [9] Kim D K, Jang I K, Seo H C, et al. Shrimp protected from WSSV disease by treatment with egg yolk antibodies (IgY) against a truncated fusion protein derived from WSSV[J]. Aquaculture, 2004, 237(1/4):21-30.
- [10] Ibrahim E S M, Shofiqur Rahman A K M, Isoda R, et al. In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY)[J]. Vaccine, 2008, 26(17):2073-2080.
- [11] Jiang J P, Zhou J, Chen J, et al. Effect of chicken egg yolk antibody against adipose tissue plasma membranes on carcass composition and lipogenic hormones and enzymes in pigs[J]. Livestock Science, 2007, 107(2/3): 235-243.
- [12] Rajeev K J, Xu Z R, Shen J, et al. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*[J]. Immunology Letters, 2006, 105(1):68-76.
- [13] Young C A, Silversides F G, Jones S R M. Chicken-derived IgY recognizes developing and mature stages of *Loma salmonae* (Microsporidia) in Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp.[J]. Aquaculture, 2007, 273:398-404.
- [14] 易全茂, 谢艳霞. 鸡卵黄抗体研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2004, 21(2):44-45.
- [15] 杨菲菲. 卵黄抗体研究进展及应用[J]. 现代农业科技, 2008(20):231-232.
- [16] 王金洛, 徐福州. 卵黄抗体研究进展[J]. 农业新技术, 2003(6):36-38.
- [17] 高建, 周玉春, 黄宇烽. 鸡卵黄抗体的纯化及临床应用[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(2):166-170.
- [18] 崔桂清, 李火举. 卵黄抗体在防治仔猪腹泻上的应用[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(3):62-63.
- [19] 储卫华, 高国峰. 卵黄抗体被动免疫防治仔猪产肠毒素大肠杆菌性腹泻[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(6): 616-617.
- [20] 杨帆, 张连峰. 卵黄抗体的分离提取和纯化方法[J]. 中国比较医学杂志, 2007(11):6-7.
- [21] 朱晓东, 陈大健, 郭永刚, 等. 卵黄抗体的提纯及应用[J]. 家禽科学, 2007(3):41-43.
- [22] 毛宁, 赖琼华, 杨岩花, 等. 免疫防治在鳖养殖中的应用[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 1999, 4(3):24-28.
- [23] 李肖梁, 马有智, 方维焕. 特异性卵黄抗体添加剂对中华鳖摄食和生长的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(3): 426-428.
- [24] 张绍兰. 鸡卵黄抗体研究进展[J]. 西南军医, 2008, 10(3):121.

Preparation of IgY and its Antibacterial and Phagocytize Opsonize Effects Against *Listonella anguillarum*

ZHOU Yong-qiang, LI Deng-feng*, LIU Lian-guo, GUO An-nan, CHEN Jiong, WANG Chong-bin

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Listonella anguillarum* (*Vibrio anguillarum*) is responsible for causing vibriosis in numerous marine and aquatic animals. To prepare specific egg yolk antibody (IgY) against it, laying hens were immunized with purified and inactivated *L. anguillarum* for three times. IgY were separated and purified from the yolk of the eggs collected one month after injection by acetic acid buffer dilution method, salting-out with ammonium sulfate and sodium sulfate, and dialysis with PBS. The concentration and the purity of IgY was detected by OD value and SDS-PAGE. Titer of the IgY was detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Results show that concentration of purified IgY is $8.93 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the mean production from each egg is 120 mg and the titer is 1:20480. Phagocytize opsonize effects, bacteriostasis in vivo & in vitro of the prepared IgY were measured. Rate of bacteriostasis in vitro experiment is 65%; The IgY can raise the phagocytize opsonize effects rate to 75%; IgY can prolong the survival time of artificially infected crayfish *Procambarus clarkia* and reduce mortality rate from 100% to 66.7%. In conclusion, the prepared IgY against *L. anguillarum* can restrain the growth of *L. anguillarum* and enhance the phagocytosis of *L. anguillarum* by blood cells.

Key words: *Listonella anguillarum*; IgY; preparation; bacteriostatic activity; phagocytize

(责任编辑 史小丽)