

## 抗迟钝爱德华氏菌卵黄抗体制备及其 抑菌、吞噬调理活性分析

顾叶华, 李登峰\*, 周永强

(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:** 迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是常见人畜共患病病原。为获得高效抗 *E. tarda* 卵黄抗体(Immunoglobulin of Yolk, IgY), 将纯培养的迟钝爱德华氏菌灭活, 免疫蛋鸡, 由蛋黄纯化 IgY, 用间接 ELISA 法检测 IgY 效价。对制备的 IgY 进行了抑菌活性检测和动物保护实验: 分别将抗 *E. tarda* IgY、普通鸡蛋 IgY 与 *E. tarda* ( $2 \times 10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup>) 孵育, 涂平板, 菌落计数; 分别将抗 *E. tarda* IgY、普通鸡蛋 IgY 与 *E. tarda* ( $2 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>) 等体积混合后注射克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*), 记录各组成活率。检测抗 *E. tarda* IgY 的吞噬调理活性: 分别将抗 *E. tarda* IgY、普通鸡蛋 IgY 与 *E. tarda* ( $10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup>) 及小鼠血细胞混合后, 接种平板培养、计数。结果发现: 制备的 IgY 质量浓度为  $8.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每个鸡蛋可以获得 IgY 约 130 mg, 效价为 1:10 240; 体外相对抑菌率为 86.6%; 对克氏原螯虾的平均保护率为 66.7%; 能促进细胞吞噬 *E. tarda*, 相对吞噬率为 79.8%。

**关键词:** 迟钝爱德华氏菌; 卵黄抗体; 制备; 抑菌活性; 吞噬调理

中图分类号: S948

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2018) 05-0001-06

迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 是一种兼性厌氧菌。其宿主范围非常广泛, 包括人、爬行动物、两栖动物、鱼类等, 是常见人畜共患病病原, 危害大<sup>[1-2]</sup>。在水产领域, *E. tarda* 已成为严重威胁淡、海水鱼类的细菌性病原, 给水产养殖业造成巨大经济损失<sup>[3-5]</sup>。此外, *E. tarda* 可造成致死性的食源性感染, 如食用感染 *E. tarda* 的水产品后可能出现腰大肌与硬膜外脓肿等<sup>[2]</sup>。目前治疗迟钝爱德华氏菌病最常用的药物为抗生素, 但大量抗生素的持续使用, 不仅易导致菌产生抗药性, 形成难以对付的超级细菌, 还可引发药物对宿主的毒副作用以及药物残留所致的环境和食品污染问题<sup>[6]</sup>。禽卵黄抗体(Immunoglobulin of Yolk, IgY)是抗生素的最佳替代品<sup>[7]</sup>, 并已成为当前研究的热点。

卵黄抗体指从免疫禽蛋中提取出的针对特定

抗原的抗体, 是存在于卵黄中的最主要免疫球蛋白, 具有较强的特异性, 无任何毒副作用<sup>[8]</sup>。与哺乳动物的抗体(Immunoglobulin G, IgG)相比, IgY 具有较强的热稳定性、耐酸碱性和易储存。此外, 从禽蛋中获得 IgY, 不仅符合动物保护法要求, 而且成本低、制备方便, 平均一只母鸡一年可产 40 g IgY, 便于大规模生产。众多研究结果表明<sup>[8-17]</sup>, 卵黄抗体在食品添加、口腔医学、检测诊断、病害防治等方面具有重要的应用。但迄今为止, 有关 IgY 应用在水产病害防治方面的报道较少<sup>[10]</sup>, 共 10 余篇, 对象包括鱼类、甲鱼(抗嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*)<sup>[18]</sup>、对虾(抗白斑杆状病毒 WSSV、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*)<sup>[13, 19-22]</sup>和小鲍鱼(抗溶藻弧菌 *V. alginolyticus*)<sup>[23]</sup>。其中以 IgY 防治鱼病的报道相对较多, 涉及日本鳗鲡(抗迟缓爱德华氏菌 *E. tarda*)<sup>[12]</sup>、虹鳟鱼(抗鳃弧菌 *Vibrio*

收稿日期: 2018-01-23。

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

基金项目: 国家海洋局开放基金(HY201602); 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); 宁波大学王宽诚幸福基金。

第一作者: 顾叶华(1991-), 女, 江苏泰州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: 1040267973@qq.com

\*通信作者: 李登峰(1975-), 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

*anguillarum*)<sup>[24]</sup>、香鱼(抗鳗弧菌)<sup>[25]</sup>、锦鲤(抗杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida*)<sup>[26]</sup>和大菱鲈(抗迟缓爱德华氏菌)<sup>[27]</sup>。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 俗称小龙虾, 具有重要的经济价值, 关于克氏原螯虾疾病的研究较少<sup>[28]</sup>。克氏原螯虾因其适应范围广、易于饲养等特性, 被水产界接纳为模式生物进行感染和免疫学试验研究<sup>[28-32]</sup>。然而, 关于卵黄抗体对克氏原螯虾保护的报道却罕见, 迄今仅有周永强等<sup>[9]</sup>于 2012 年报道的抗鳗利斯顿氏菌鸡卵黄抗体对克氏原螯虾的保护作用; Lu 等<sup>[33]</sup>于 2009 年报道的抗 WSSV 卵黄抗体对克氏原螯虾的保护作用。

本文以灭活的迟钝爱德华氏菌纯培养物作为抗原, 制备抗迟钝爱德华氏菌 IgY, 探讨其抑菌、吞噬调理活性, 以期对迟钝爱德华氏菌病害的防治奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SPF 海兰白蛋鸡: 购自宁波慈溪益大养殖场; 迟钝爱德华氏菌由发病甲鱼中分离、纯化、鉴定后超低温冰箱保存<sup>[34]</sup>; 克氏原螯虾: 购于宁波大学菜市场, 体重 10~15 g, 体长约 10 cm, 健壮、附肢完整, 实验室暂养 1 周后, 投入实验; BALB/C 小白鼠: 由宁波大学实验动物中心提供。辣根过氧化物酶标记羊抗鸡抗体: 购于北京博奥森生物公司; 常用试剂均为分析纯, 购于宝生物工程有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗迟钝爱德华氏菌卵黄抗体的制备

(1)母鸡免疫。在无菌环境下, 挑爱德华氏菌单菌落于 LB 培养基(pH 7.2)中, 28 °C 下培养。取培养产物离心, 菌沉淀用 PBS 悬浮后, 添加 0.5% 福尔马林溶液, 37 °C 灭活 24 h, 离心, 用 PBS 洗涤菌体 3 次, 最后菌沉淀用 PBS 悬浮并稀释至  $2 \times 10^9$  CFU·mL<sup>-1</sup>。灭活的迟钝爱德华氏菌液经皮下多点注射免疫母鸡, 每次免疫间隔 15 d, 第 3 次免疫 10 d 后, 收集鸡蛋。

(2)卵黄抗体的分离纯化。用酒精棉球对鸡蛋表面消毒, 在无菌环境下吸取卵黄, 加入 10 倍体积的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.0), 充分搅拌均匀后, 静置于 4 °C 冰箱 10 h (或过夜); 然后参考文献

[35]方法进行两步盐析; 最后用 PBS 充分透析。

#### 1.2.2 IgY 纯度检验

根据文献[35], 用 SDS-PAGE 检测抗体纯度。

#### 1.2.3 IgY 浓度测定

取 30 uL IgY 用 PBS 稀释 10 倍, 用超微量分光光度计(Nanodrop 3000)测定吸光度, IgY 质量浓度的计算公式为:

$$R_{IgY} = (1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}) \times D,$$

其中:  $R_{IgY}$  为 IgY 质量浓度, mg·mL<sup>-1</sup>;  $D$  为样品的稀释倍数。

#### 1.2.4 抗体效价测定

参照文献[9]方法, 采用改良间接 ELISA 法检测所制备的 IgY 的效价。

#### 1.2.5 体外抑菌试验

将 *E. tarda* 原液 100 μL, 经平板菌落计数, 确定原液浓度后, 进行梯度稀释。取  $2 \times 10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup> 菌液, 与抗 *E. tarda* 的卵黄抗体等体积混匀, 1 h 后取混合液涂平板(每板 100 μL), 28 °C 下培养 24 h, 菌落计数。以非免鸡蛋的普通卵黄抗体和 *E. tarda* 混合液为阴性对照组(表 1), 每组设 3 个平行。相对抑菌率计算公式为:

$$P_b = (1 - N_p / N_n) \times 100\%,$$

其中:  $P_b$  为相对抑菌率, %;  $N_p$  为阳性组菌落数;  $N_n$  为阴性组菌落数。

表 1 体外抑菌实验处理 mL

| 组别  | 抗迟钝爱德华氏菌 IgY | 普通鸡蛋 IgY | $2 \times 10^3$ CFU·mL <sup>-1</sup> 抗迟钝爱德华氏菌悬液 |
|-----|--------------|----------|-------------------------------------------------|
| 阳性组 | 1            | —        | 1                                               |
| 阴性组 | —            | 1        | 1                                               |

#### 1.2.6 动物保护试验

取卵黄抗体以 1:1 比例与  $2 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup> 的爱德华氏菌液混合作为阳性组注射液。普通鸡蛋的卵黄抗体以同样比例与菌液混合作为阴性组注射液。PBS 与菌液混合作为空白组注射液, 结果见表 2。

表 2 体内抑菌实验处理 mL

| 组别  | 抗迟钝爱德华氏菌 IgY | 普通鸡蛋 IgY | $2 \times 10^8$ CFU U·mL <sup>-1</sup> 迟钝爱德华氏菌悬液 | PBS 缓冲液 |
|-----|--------------|----------|--------------------------------------------------|---------|
| 阳性组 | 1            | —        | 1                                                | —       |
| 阴性组 | —            | 1        | 1                                                | —       |
| 空白组 | —            | —        | 1                                                | 1       |

将实验室暂养1周的克氏原螯虾随机分成3组, 每组30尾. 各试验组分别注射上述混合液(每尾0.2 mL), 观察并记录注射后1周内各组虾的死亡数目, 并计算相对保护率.

$$P_p = (1 - D_p/D_n) \times 100\%,$$

其中:  $P_p$  为相对保护率, %;  $D_p$  为阳性组死亡尾数;  $D_n$  为阴性组死亡尾数.

### 1.2.7 吞噬调理试验

取小鼠血2 mL加入肝素抗凝剂中, 离心, PBS清洗后, 用2 mL生理盐水悬浮并立即使用.  $10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup> *E. tarda* 菌液、抗*E. tarda* IgY、血细胞悬液三者等体积混合液为实验组;  $10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup> *E. tarda* 菌液、非免普通IgY、血细胞悬液三者等体积混合液为阴性对照.  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡孵育30 min. 各取100  $\mu$ L混合液, 涂平板, 28℃下培养24 h, 菌落计数, 每组设3个平行. 相对吞噬率  $P_d$  公式为:

$$P_d = (N_n - N_p)/N_n \times 100\%.$$

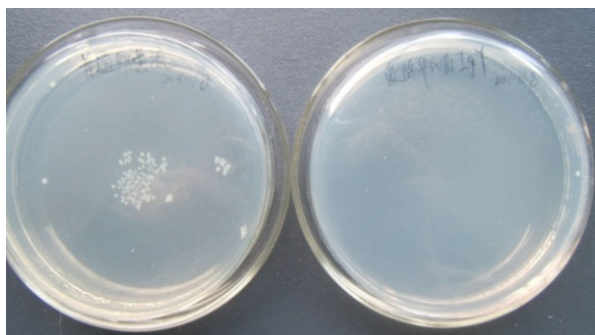
## 2 结果

### 2.1 卵黄抗体纯度与效价

提取的IgY效价为1:10 240, 质量浓度为8.8 mg·mL<sup>-1</sup>, 每个鸡蛋IgY含量约为130 mg. SDS-PAGE电泳显示: IgY的重链(66 kD)和轻链(26 kD), 无明显杂带, IgY纯度较高.

### 2.2 体外抑菌率

图1为特异卵黄抗体和非特异卵黄抗体对迟钝爱德华氏菌抑制效果比较. 从图1可知, 培养24 h后, 阳性组菌落数量明显少于阴性组, 抗迟钝爱德华氏菌IgY较非免普通鸡蛋提取的IgY能明显抑制*E. tarda*的生长和繁殖, 相对抑菌率为86.6%.



左为非特异性IgY; 右为抗迟钝爱德华氏菌特异性IgY.

图1 特异卵黄抗体和非特异卵黄抗体对迟钝爱德华氏菌抑制效果比较

### 2.3 注射方法对克氏原螯虾的免疫保护效果

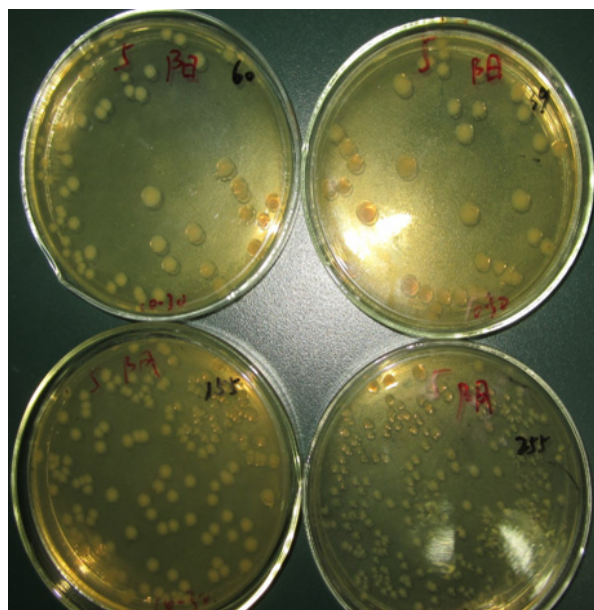
表3为采用注射抗迟钝爱德华氏菌卵黄抗体对克氏原螯虾的免疫保护作用结果. 由表3可见, 只注射爱德华氏菌液的空白对照组和注射普通卵黄抗体加*E. tarda*的阴性对照组的克氏原螯虾在1周内全部死亡, 而注射特异性抗*E. tarda*的IgY加*E. tarda*的阳性对照组存活率为66.7%, 即抗迟钝爱德华氏菌IgY保护率为66.7%.

表3 抗迟钝爱德华氏菌卵黄抗体对克氏原螯虾的免疫保护作用(注射后1周)

| 组别  | 数量/尾 | 死亡数/尾 | 保护率/% |
|-----|------|-------|-------|
| 阳性组 | 30   | 10    | 66.7  |
| 阴性组 | 30   | 30    | 0     |
| 空白组 | 30   | 30    | 0     |

### 2.4 不同试验组菌落数量和相对吞噬率

在吞噬调理实验中, 将迟钝爱德华氏菌菌液、血细胞悬液和抗迟钝爱德华氏菌卵黄抗体等体积混匀孵育30 min后, 相比于菌液加普通非免卵黄抗体加血细胞悬液而言, 有明显较强的分层和凝聚现象, 轻轻瞬时离心, 凝聚现象更为明显. 各组混合液样品在培养24 h后, 阴性组的菌落数量明显多于阳性组, 如图2所示. 阳性组的平板菌落计数均值为50.0, 阴性组为247.5, 相对吞噬率为79.8%.



上为抗迟钝爱德华氏菌IgY加迟钝爱德华氏菌; 下为普通鸡蛋提取的IgY加迟钝爱德华氏菌.

图2 吞噬调理结果

### 3 讨论

鸡蛋蛋黄的主要成分包括: 48%水、17.6%蛋白质和 30%脂肪, 平均 1 枚鸡蛋可提取 100~150 mg 左右 IgY<sup>[36]</sup>。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<sup>[37-38]</sup>, 但采用单一方法提取 IgY 往往不够理想, 综合应用多种方法效果较好。本实验联用乙酸-乙酸钠稀释、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  盐析、透析法, 每个鸡蛋可得 130 mg IgY, 效价达 1:10 240 的卵黄抗体。该方法操作简单、成本低廉, 适合 IgY 的大量纯化。

本实验以  $V_{\text{菌液}}:V_{\text{卵黄抗体}}=1:1$ , 即菌浓度为  $10^3$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 卵黄抗体终质量浓度为 4.4 mg·mL<sup>-1</sup> 进行体外抑菌实验。实验结果表明, 制备的迟钝爱德华氏菌 IgY 相对抑菌率为 86.6%, 抑菌效果明显。

在体内高剂量(每尾  $0.2 \times 10^8$  CFU)迟钝爱德华氏菌攻毒试验中, 空白对照组和阴性对照组的克氏原螯虾 1 周内全部死亡, 而同期添加了迟钝爱德华氏菌 IgY(每千克 88 mg IgY)的阳性组存活率为 66.7%, 即制备的抗迟钝爱德华氏菌 IgY 的相对保护率为 66.7%。此前, 关于抗菌 IgY 对克氏原螯虾保护性研究报道中<sup>[9]</sup>, 抗鳃利斯顿氏菌鸡卵黄抗体对克氏原螯虾的保护率为 33.3%。本研究制备的卵黄抗体对克氏原螯虾的保护率为 66.7%, 明显高于前者。而前者的抗体效价为 1:20 480, 高于本研究的 1:10 240。究其原因可能和菌种及抗原制备过程中菌的培养方式等有关, 具体机制有待进一步研究。李媛<sup>[27]</sup>以口服灌胃方式治疗被攻毒的大菱鲃(每千克鲃 200 mg IgY), 其相对保护率为 69%。李肖梁等<sup>[18]</sup>将制备的抗嗜水气单胞菌 IgY 添加进饲料投喂甲鱼, 治愈率约 83.3%。王斌等<sup>[39]</sup>研究发现, 经口服和腹腔注射 IgY 给大菱鲃进行免疫, 口服治愈率达 83.3%, 但注射治愈率为 0%, 认为可能是注射 IgY 的方式使机体产生了较强烈的应激, 故导致保护失效。本研究采取注射法免疫, 虽然较文献[18-19]口服效果略低, 但远好于文献[19]的注射法。其原因可能是: (1)本研究制备的 IgY 纯度高, 减少了杂质对机体造成的应激反应; (2)文献[19]的注射剂量偏低(每尾只有 0.019 mg IgY)。

血细胞在甲壳动物免疫防御中发挥着重要的

作用。当受到病原侵袭时, 血细胞首先参与免疫应答进行吞噬或被诱导脱颗粒<sup>[40]</sup>。在吞噬调理试验中, 由菌液添加了特异抗 *E. tarda* IgY 和血细胞的阳性组培养获得的菌落数远低于菌液添加非免普通鸡蛋的 IgY 和血细胞的对照组, 相对吞噬率为 79.8%, 表明 IgY 能够促进吞噬细胞对菌的吞噬和杀灭。文献[41-42]认为 IgY 治疗细菌感染的主要机理之一是通过细菌的黏附和沉淀作用。李媛<sup>[27]</sup>猜测 IgY 的吞噬调理作用可能是因为在特异性 IgY 的作用下, 细菌相互凝集, 特异性 IgY 与菌体形成复合物后方便细胞吞噬。本研究的吞噬调理试验中阳性组有明显较强的分层和凝聚现象, 表明抗爱德华氏菌 IgY 对血细胞及细菌确实有促进黏附、凝集的作用。爱德华氏菌是水体中常见的条件致病菌, 当养殖环境恶化, 甲壳类养殖动物免疫机能下降时, 就有可能导致疾病的暴发。饲喂或注射特异性 IgY 或高免鸡蛋, 可以提高养殖对象对病菌的免疫杀伤力, 预防或治疗疾病的爆发。

### 参考文献:

- [1] 杜迎春, 杨菊凤, 时晓, 等. 迟钝爱德华氏菌的分离鉴定及体外抑菌效果研究[J]. 河南农业, 2017(8):51-52.
- [2] Suzuki K, Yanai M, Hayashi Y, et al. *Edwardsiella tarda* bacteremia with psoas and epidural abscess as a food-borne infection: A case report and literature review[J]. Internal Medicine, 2017, 57(6):893-897.
- [3] 刘双凤. 迟钝爱德华氏菌在水产动物中致病性及致病因子的若干研究[J]. 黑龙江水产, 2014(1):35-37.
- [4] 陈言峰, 卓孝磊, 王超, 等. 鲢鱼致病性迟钝爱德华氏菌的鉴定及药敏分析[J]. 水产科学, 2017, 36(1):48-53.
- [5] 倪春山. 重要海洋病原细菌迟钝爱德华氏菌感染小鼠及细胞的研究模型建立[D]. 上海: 华东理工大学, 2015.
- [6] 王波, 莫照兰. 迟缓爱德华氏菌及其致病机理[J]. 海洋科学集刊, 2007, 48:138-144.
- [7] Kollberg H. Avian antibodies (IgY) to fight antibiotic resistance[J]. Clinical Microbiology, 2015, 4(2):1-5.
- [8] 亓秀晔, 宋翔, 王业华, 等. 卵黄抗体在疾病防治中的应用[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(5):80-86.
- [9] 周永强, 李登峰, 刘联国, 等. 抗鳃利斯顿氏菌鸡卵黄抗体制备及其活性研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2012, 25(4):1-5.
- [10] 李海平. 禽卵黄抗体应用研究综述[J]. 产业与科技论坛, 2017, 16(3):82-83.

- [11] Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: A review[J]. Journal of Medicinal Food, 2002, 5(3):159-169.
- [12] Gutierrez M A, Miyazaki T, Hatta H, et al. Protective properties of egg yolk IgY containing anti-*Edwardsiella tarda* antibody against paracolo disease in the Japanese eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 16(2):113-122.
- [13] Xu Y P, Li X Y, Jin L J, et al. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6):860-868.
- [14] Shi H, Zhu J, Zou B, et al. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 95:1734-1742.
- [15] Zhang L P, Li D F, Liu L G, et al. A rapid immunochromatographic test strip for detecting swimming crab reovirus[J]. Disease of Aquatic Organism, 2015, 117:21-29.
- [16] Zhang L P, Li D F, Liu L G, et al. Development of colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus[J]. Journal of Virological Methods, 2015, 221:39-45.
- [17] Oliver C, Valenzuela K, Silva H, et al. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 119(2):365-376.
- [18] 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.
- [19] 卢亚楠. 抗对虾白斑综合症病毒特异性卵黄抗体的制备及其保护作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2009.
- [20] Kumaran T, Thirumalaikumar E, Lelin C, et al. Physicochemical properties of anti *Vibrio harveyi* egg yolk antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 74:349-362.
- [21] Gao X, Zhang X, Lin L, et al. Passive immune-protection of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-vibrio egg yolk (IgY)-encapsulated feed[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5):723-733.
- [22] Lu Y, Liu J, Jin L, et al. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(5):604-610.
- [23] Wu C J, Wang H, Chan Y L, et al. Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4/5):1042-1048.
- [24] Arasteh N, Aminirissehei A H, Yousif A N, et al. Passive immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with chicken egg yolk immunoglobulins (IgY)[J]. Aquaculture, 2004, 231(1/4):23-36.
- [25] Li C H, Lu X J, Li D F, et al. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Vibrio anguillarum* infection in ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 37(1): 108-114.
- [26] Gan H, He H, Sato A, et al. Ulcer disease prophylaxis in koi carp by bath immersion with chicken egg yolk containing anti-*Aeromonas salmonicida* IgY[J]. Research in Veterinary Science, 2015, 99:82-86.
- [27] 李媛. 迟缓爱德华氏菌特异性卵黄抗体对大菱鲶的被动保护研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
- [28] 陈昌福. 淡水螯虾传染性疾病的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4):507-512.
- [29] 雷质文, 黄健, 莫照兰. 人工感染白斑综合征病毒的克氏原螯虾的病理学试验[J]. 中国兽医科学, 2002, 32(10):23-25.
- [30] 魏静, 陆承平, 杨丛海. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(4):78-82.
- [31] Yan D C, Dong S L, Huang J, et al. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 94(2):144-148.
- [32] 许梓荣, 魏克强. 克氏原螯虾口服疫苗免疫对白斑综合征病毒人工感染的保护作用[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6):588-590.
- [33] Lu Y, Liu J, Jin L, et al. Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV)[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2009, 159(3):750-758.
- [34] 胡广洲, 李登峰, 苏秀榕, 等. 患暴发性败血症中华鳖体内细菌的分离与鉴定[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 859-868.
- [35] 李敏慧, 邹强, 刘阳, 等. 鸡卵黄抗体 IgY 的分离纯化及鉴定[J]. 生物学杂志, 2009, 26(6):80-82.
- [36] 甄宇红. 抗奶牛乳腺炎特异性卵黄抗体的制备及活性

- 研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [37] 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, 17(11):6-7.
- [38] 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.
- [39] 王斌, 刘永波, 刘双凤, 等. 鸡抗迟缓爱德华氏菌卵黄抗体的应用研究[J]. 大连海洋大学学报, 2006, 21(3): 203-206.
- [40] Johansson M W, Lind M I, Holmblad T, et al. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1995, 216(3):1079-1087.
- [41] Zhen Y H, Jin L J, Guo J, et al. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(5):1529-1535.
- [42] Tini M, Jewell U R, Camenisch G, et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology, 2002, 131(3):569-574.

## Preparation of IgY and its antibacterial, phagocytize opsonize effects against *Edwardsiella tarda*

GU Ye-hua, LI Deng-feng\*, ZHOU Yong-qiang

( Applied Marine Biotechnology Key Laboratory of the Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China )

**Abstract:** *Edwardsiella tarda* is responsible for causing bacterial disease in variety of animals (reptiles, amphibians, and fishes, including catfish, turbot and eels). To prepare specific egg yolk antibody (IgY) against it, laying hens were immunized with purified and inactivated *E. tarda* for three times. IgY were separated and purified from the yolk of the eggs collected one month after injection by acetic acid buffer dilution, salting-out with ammonium sulfate, and dialysis with PBS. Titer of the IgY were detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. The concentration and the purity of the IgY were detected by OD value and SDS-PAGE. Results show that concentration of purified IgY is  $8.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the mean production from each egg is 130 mg and the titer is 1:10 240. Phagocytize opsonize effects, bacteriostasis in vivo & in vitro of the prepared IgY were measured. Rate of bacteriostasis in vitro experiment is 86.6%; The IgY can rise the phagocytize opsonize effect rate to 79.8%; IgY can protect artificially infected crayfish *Procambarus clarkia* and reduce mortality rate from 100% to 66.7%.

**Key words:** *Edwardsiella tarda*; IgY; preparation; bacteriostatic activity; phagocytize opsonize

(责任编辑 史小丽)