

对虾鳃弧菌卵黄抗体(IgY)的制备及其对人工感染的保护研究

朱香萍¹, 张再生², 刘宗柱¹

(1. 青岛农业大学, 山东 青岛 266109; 2. 烟台出入境检验检疫局 蓬莱办事处, 山东 蓬莱 265600)

摘要: 以纯培养的鳃弧菌作为抗原, 探讨对虾鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)卵黄抗体(IgY)的制备技术, 以及IgY在对虾体内的代谢及对人工感染和自然感染弧菌病的保护作用。结果表明: 鳃弧菌对蛋鸡有较好的免疫原性, 产蛋鸡经免疫后, 血清与卵黄中很快出现抗体, 而且卵黄中的抗体水平要高于血清中的抗体水平。IgY对鳃弧菌的感染有可靠的保护作用, IgY经口服后很快到达直肠, 继而血淋巴、肝胰脏中也出现抗体, 并可持续12~24 h; 投喂IgY的试验组对虾在7 d内的死亡率为15%, 极显著地低于对照组对虾的同期死亡率(为60%)。

关键词: 对虾; 弧菌病; 被动免疫; 卵黄抗体(IgY)

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)02-0025-04

由细菌引起的对虾疾病常见的有红肢病(红腿病)、幼体菌血症; 烂眼病、褐斑病、甲壳溃疡病、烂鳃病、发光病、黄鳃病、幼体肠道细菌病、丝状细菌病等。在这些细菌性疾病中, 弧菌是最主要的病原菌。1994年第9版《Bergey's 细菌鉴定手册》中收录了34种弧菌, 中国报道的养殖对虾的病原菌就占了其中的1/3^[1]。

对虾的免疫体系较为原始, 缺乏体液免疫系统, 其免疫防御主要通过循环血淋巴细胞的吞噬、包裹、凝聚和凝固等作用来完成。对虾的免疫防御体系在正常情况下可以抵御其生活环境中存在的病原体的侵染和致病, 这也正是野生环境中对虾可以携带病原体但并不发病且能正常生长的重要原因^[2]。提高对虾的免疫机能, 增强其对病原体的抵抗能力, 是控制养殖对虾传染性病害的有效措施, 但由于对虾缺乏体液免疫系统, 应用疫苗的主动免疫方法在对虾上是无效的。被动免疫是动物获得免疫力的另一重要途径, 卵黄抗体(egg yolk immunoglobulin, IgY)用于禽类疫病防治方面的有很多成功的研究报道, 且已有产品应用于生产中, 如用于紧急预防和治疗传染性法氏囊病(IBD)、新城疫(ND)等疫病的IgY, 效果很好。在水产动物方面, 只对鳖有少量研究^[3], 在对虾细菌病方面则未见研究报道。本研究的目的是借鉴陆生畜禽相关研究的成功经验, 以纯培养的鳃弧菌作为抗原, 探讨鳃弧菌IgY的制备技术, 并研究其在对虾体内的代谢及对人工感染的保护作用。

1 材料与方法

1.1 抗原的制备

鳃弧菌菌种为中国科学院实验海洋生物学开放

研究室分离、鉴定后保存的菌种, 菌种编号: OSE9803。菌种经活化后接种于固体培养基(蛋白胨5 g, 酵母浸膏粉1 g, 磷酸高铁0.1 g, 琼脂20 g, 海水加至1 000 mL, 调pH值至7.60, 105 kPa, 高温灭菌20 min), 30℃培养24 h后, 以无菌海水冲洗配制悬浮液, 控制其600 nm处光密度为0.7, 活菌数约10⁸个/mL。加入0.5%甲醛于鳃弧菌悬液, 4℃灭活24 h, 经检验无活菌后加入蜂胶佐剂, 混匀即得。

1.2 蛋鸡的强化免疫

选择健康蛋鸡200只, 笼养, 常规喂料, 饮水。每只蛋鸡胸肌分点注射鳃弧菌免疫原0.5 mL进行基础免疫; 基础免疫后7 d, 同法注射免疫原1.5 mL/羽进行加强免疫, 7 d后, 再肌注免疫原1.5 mL/羽进行强化免疫, 并根据IgY效价水平的变化, 决定是否再次强化免疫并确定免疫时间。

1.3 鳃弧菌卵黄抗体的制备

经抽检合格的高免鸡蛋先用自来水洗去表面的污物, 再用1:400双链季铵盐消毒液浸泡消毒20 min。取出置无菌室晾干, 无菌操作打开蛋壳, 取出蛋黄倒入灭菌容器内。

根据每批蛋黄液抗体滴度的高低, 加入适量灭菌生理盐水稀释到凝集效价1:256, 置预先灭菌的搅

收稿日期: 2007-07-19; 修回日期: 2007-12-12

基金项目: 山东省出入境检验检疫局项目(SK03-2000)

作者简介: 朱香萍(1968), 女, 山东蓬莱人, 副教授, 主要从事动物遗传育种、细胞生物学等方面的研究; 刘宗柱, 通讯作者, 电话: 13376422619, E-mail: Liuzongzhu@126.com

拌缸内, 1 500 r/min 匀浆 5 min, 灭菌纱布过滤后加入青、链霉素各 1 000 IU/mL, 分装于灭菌瓶中压盖密封, 冷冻保存备用。

1.4 卵黄抗体的检测

无菌检验: 取制备好的蛋黄液 0.5 mL 分别涂布于血琼脂平板和厌氧肉汤培养基中, 37 °C 培养 24 h, 检验是否无菌生长。

急性安全性检验: 取昆明小白鼠 10 只, 体质量 18~22 g, 雌雄各半, 每只灌胃 2 mL, 常规饲养, 观察 10 d, 检查是否健康成活。

抗体效价测定: 以纯培养的鳃弧菌作为标准抗原, 用试管凝集法测定 IgY 的效价。

1.5 卵黄抗体吸收代谢试验

投饵及取样: 试验用对虾取自秋季人工养殖的斑节对虾, 体长 12~15 cm, 雌雄各半。试验材料运回实验室放于玻璃缸水槽内暂养, 每天换水 60%、吸底一次, 连续充气。抗体饵料是将制备保存的 IgY 拌入配合饵料(0.1 mL/g), 45 °C 烘干而成。试验对虾饥饿 24 h 后投抗体饵料, 并于投饵前及投饵后 3, 8, 12, 24 h 分别随机捞取试验虾 5 尾, 立即抽血取血淋巴, 剖取肝胰腺、直肠于 -20 °C 保存待测。

抗体检测: 肝胰腺、直肠匀浆及血淋巴中抗体含量用酶联免疫法(ELISA)测定, 生物素化鼠抗鸡 IgG、标准 IgY、Avidin HRP 均购自 Promega 公司, 匀浆液 7 000 r/min 离心取上清液测定抗体效价, 具体步骤参照文献[4]进行。

1.6 人工感染保护试验

试验动物及分组: 取试验虾 60 尾, 雌雄各半, 随机分为 3 组, I 组为试验组, II 组为对照组, III 组为空白对照组。I 组投喂含卵黄抗体 1% 的饵料, II, III 组投喂含普通卵黄 1% 的饵料。投饵后 2 h 进行人工攻毒试验。

人工感染方法: 攻毒鳃弧菌经活化后接种于固体培养基, 30 °C 培养 24 h, 用灭菌海水洗下, 制悬浮液, 活菌数约 10^8 个/mL。II 组于对虾第二腹节侧面注射 30 μ L/尾, III 组同法注射灭菌海水作为空白对照。通过预备实验发现对虾人工感染后死亡多发生于注射后 1~6 d, 所以观察 1 周内各组试验虾的死亡情况, 并进行统计分析。

2 结果

2.1 产蛋鸡免疫后鳃弧菌抗体的变化规律

产蛋鸡免疫后鳃弧菌抗体的变化见图 1。

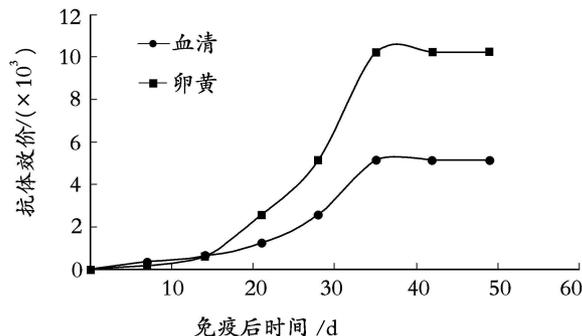


图 1 蛋鸡免疫后血清、卵黄中鳃弧菌抗体效价变化

Fig.1 Vibrio antibody's titer in serum and yolk of laying hens after immunization

结果表明: 产蛋鸡免疫前血清和卵黄中没有检测到鳃弧菌抗体的存在, 经鳃弧菌免疫后, 血清与卵黄中很快出现抗体, 而且卵黄中的抗体水平要高于血清中的抗体水平, 说明鳃弧菌对蛋鸡有较好的免疫原性, 所产生的抗体可以主动转运进入卵黄。

2.2 卵黄抗体检测

经检验, 试验样品均无菌生长, 说明 IgY 的制备过程没有杂菌污染; 经小鼠灌胃试验, 没有小鼠死亡, 也未发现其他异常表现, 表明 IgY 是安全的。

2.3 卵黄抗体吸收试验

投喂 IgY 后对虾体内不同组织中抗体浓度变化见图 2。

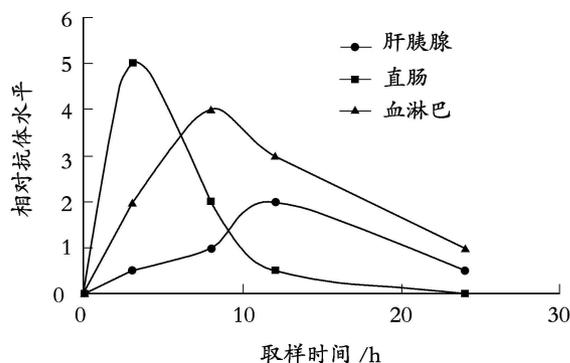


图 2 投喂后 IgY 对虾体内不同组织中抗体浓度变化

Fig.2 Antibody changes in different tissues of shrimp after feeding IgY

结果显示, IgY 经口服后很快到达直肠, 继而血淋巴中也出现抗体, 并可持续 12~24 h, 肝胰腺也可出现抗体, 但浓度稍低。

2.4 卵黄抗体对人工感染鳃弧菌的保护作用

人工感染后各组试验虾的死亡情况见表 1。

表 1 各组试验虾 7 d 内死亡率

Tab. 1 The death rate of each group in 7 days

组别	样本数(尾)	存活数(尾)	死亡率(%)
I	20	17	15 ^B
II	20	8	60 ^A
III	20	19	5

注: A, B 表示两组之间差异显著

由上述结果可以看出: 人工感染后, 投喂普通卵黄的对照组(II 组) 对虾死亡率为 60%, 发病虾约有 50% 在第 1 天死亡, 外观无明显症状, 病程较长的死亡虾表现出典型的弧菌病症状。投喂卵黄抗体的试验 I 组对虾于感染当天多数亦表现出游泳迟缓、摄食减少等症状, 其中 2 条虾当天死亡, 其后症状逐渐减轻, 7 天后恢复正常, 该组对虾的死亡率约为 15%, 极显著地低于对照组(II 组)。空白对照组对虾也有 1 条于当天死亡, 分析原因可能是由于注射应激所致。

3 结论

3.1 鳗弧菌卵黄抗体的制备

鸡卵黄免疫抗体分子质量约为 180 ku, 含两个亚单位, 即 67~ 70 ku 的重链和 22~ 30 ku 的轻链, 又称 IgY, 存在于免疫后母鸡的卵黄中。实验证明, 受免疫原刺激后, 母鸡产生免疫反应, 在输卵管内卵黄成熟期, 血液中 IgG 可被选择性地转移到卵黄中, 而且是卵黄中唯一的免疫球蛋白类^[5]。早在 20 世纪 60 年代, 科学家们就发现鸡卵黄中存在 IgG 抗体, 其含量与鸡血清相似甚至更高, 但一直未引起足够的重视。显然是由于很难将 IgG 抗体从丰富的卵黄脂质中分离出来, 使得鸡蛋作为抗体来源的研究受到限制。直到 20 世纪 80 年代初, Polson 等^[6] 和 Jensenius 等^[7] 相继建立了有效且相对简便的聚乙二醇(PEG) 提取法和硫酸葡聚糖提取法, 有关这方面的研究才大量涌现, 并且被广泛应用到生物学的许多领域, 但应用海洋弧菌作为抗原免疫蛋鸡制备相应卵黄抗体, 未见相关研究报告。本研究发现, 利用纯培养的海洋鳗弧菌, 以蜂胶为免疫佐剂, 可以有效刺激蛋鸡的免疫系统, 血清和卵黄中均有较高的抗体水平, 并且于强化免疫结束后还能维持较长的时间, 表明制备鳗弧菌 IgY 的技术是可行的。

3.2 卵黄抗体的吸收及代谢

陆生哺乳动物的某些种类, 初生动物通过初乳获得被动免疫就是消化道吸收初乳中抗体的过程。应用被动免疫的方法增高动物体内的抗体水平, 在家禽养殖生产中是控制疾病的有效手段。鉴于对虾

养殖生产的特点, 应用口服途径是卵黄抗体技术应用的可行方法, 但这一技术首先要研究对虾对卵黄抗体的吸收及代谢。本研究结果表明, 卵黄抗体随饵料进入对虾消化道后, 在直肠内有较高的浓度分布, 继而可进入到血淋巴。

大量研究表明, 低等水生动物消化道具有吸收完整大分子蛋白质的功能, 尤以后肠最为明显, 这是卵黄抗体可以通过肠道的吸收进入血淋巴的基础。另一方面, IgY 作为分泌型蛋白质, 对蛋白酶的水解具有一定的抵抗力, 将胃蛋白酶和 IgY 在 pH 4.0 温育 1 h 后可保持 91% 的活性, 甚至温育 10 h 后仍有 63% 的活性^[8]。

3.3 卵黄抗体对人工感染弧菌病的保护作用

在鳗弧菌的感染中, 对虾发病与否及发病后病程的发展, 与鳗弧菌的感染剂量有很大的关系, 同时也与不同个体的体质、免疫系统活性密切相关^[9]。正常情况下, 对虾生活的水体环境、对虾体内均有弧菌生存, 但并不引起对虾发病。只有当环境恶劣, 或对虾体质下降, 弧菌在对虾体内大量繁殖, 才造成对虾的发病。

弧菌侵入对虾机体后的繁殖情况, 取决于对虾免疫机能与感染弧菌的平衡。对虾缺乏体液免疫系统, 主要是靠血淋巴细胞的吞噬、包埋等对侵入的致病菌起抑制和杀灭作用, 致病菌一旦突破细胞免疫防御体系的抑制, 便会大量繁殖造成对虾迅速发病^[10]。

在陆生畜禽的养殖实践中, 当传染性疾病发生时, 给发病动物注射高免抗体, 以被动免疫的方法提高动物体内抗体水平, 可有效控制疾病的发展。在本试验中, 通过口服途径使对虾体内保持一定的抗体水平, 可以大大提高人工感染鳗弧菌后对虾的存活率, 表明卵黄抗体对人工感染鳗弧菌病有明显的保护作用, 至于田间生产试验的保护效果, 尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈梅. 弧菌(*Vibrio*)与渔业生物及与人类病害评述[J]. 海洋湖沼通报, 1999, 1: 62-68.
- [2] 胡超群, 陶宝华. 对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展[J]. 热带海洋, 2000, 19(3): 84-94.
- [3] 王刚, 吕殿红. 卵黄抗体应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2002, 23(1): 16-17.
- [4] 王忠泽, 侯晓军, 萌俊, 等. 抗大肠杆菌 O157: H7 鸡卵黄抗体的制备及其被动保护作用的研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18(2): 17-20.

- [5] 杨婷婷. 鸡卵黄抗体(IgY)的提纯及其在医学上的应用 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 76-78.
- [6] Polson A, Coetzer T, Kruger J, *et al.* Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens [J]. **Immunological Investigations**, 1985, 14(4): 323-327.
- [7] Jensenius J C, Andersen I, Hau J, *et al.* Eggs: conveniently packed antibodies: methods for purification of yolk IgG [J]. **Journal of Immunological Methods**, 1981, 46: 63-68.
- [8] Hatta H, Tsuda K, Akachi S, *et al.* Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes [J]. **Biosci Biotechnol Biochem**, 1993, 57: 1077-1081.
- [9] Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by a probiotic bacterium (*Bacillus S11*) [J]. **Aquaculture**, 2000, 191: 271-288.
- [10] 陈国福, 黄捷, 宋晓玲. 对虾免疫机能研究概况 [J]. 水产学报, 2004, 28(2): 209-215.

Preparation of shrimp *Vibrio anguillarum* IgY and its effect on protecting from artificial infection

ZHU Xiang-ping¹, ZHANG Zai-sheng², LIU Zong-zhu¹

(1. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 2. Penglai Bench of Yantai Entry-Export Inspection & Quarantine Bureau, Penglai 265600, China)

Received: Jul. 19, 2007

Key words: shrimp; *Vibrio*; passive immunity; IgY (egg yolk immunoglobulin)

Abstract: The purely cultivated *Vibrio anguillarum* was taken as an antigen to explore the preparation technology and the metabolism in shrimp body of IgY, and the effect on protecting from artificially infected *Vibrio anguillarum*. The result showed that *Vibrio anguillarum* had a strong immunity of laying hens. Antibody was detected in blood serum and vitellus soon after the laying hens were immunized, and the antibody level in vitellus was higher than that in serum. After oral administration, IgY could be detected at rectum, blood lymph and also in hepaticopancrea of shrimp which lasts about 12~24 h. The death rate within 7 days of the tested group was 15%, significantly lower than that of the control (60%, $P < 0.01$), showing good protection of IgY from vibriosis infection.

(本文编辑: 刘珊珊)