

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210420002

http://www.yykxjz.cn/

王仁宝, 王一婷, 张惠芬, 宋晓玲, 万晓媛, 谢国驹, 史成银. 口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护效果. 渔业科学进展, 2022, 43(4): 226-233

WANG R B, WANG Y T, ZHANG H F, SONG X L, WAN X Y, XIE G S, SHI C Y. Protective effects of oral specific egg yolk immunoglobulins (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(4): 226-233

口服特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾 抗 WSSV 感染的免疫保护效果*

王仁宝^{1,2} 王一婷^{1,3} 张惠芬^{1,3} 宋晓玲¹
万晓媛¹ 谢国驹¹ 史成银^{1①}

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海水养殖病害防治重点实验室 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 上海 201306; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 辽宁 大连 116023)

摘要 为探讨特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)的免疫保护机制及效果,本研究以添加不同剂量 WSSV 卵黄抗体制剂(0、0.2%和 0.5%)的饲料投喂凡纳滨对虾幼虾,免疫 28 d 后使用 WSSV 进行人工感染,测定感染对虾的肝胰腺免疫酶活力和免疫基因表达水平,以及感染后 14 d 内对虾的存活率。结果显示, WSSV 感染 3 d 后,与未添加卵黄抗体制剂的对照组相比,0.2%免疫组对虾肝胰腺的超氧化物歧化酶(SOD)和酚氧化酶(PO)活力显著升高,酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活力显著降低,热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)表达水平显著升高,凝集素基因(*lectin*)和 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因(β -*GBP-HDL*)表达水平显著降低;0.5%免疫组对虾肝胰腺的 SOD 活力显著升高,ACP 和 AKP 活力显著降低,*Hsp70* 基因表达水平显著升高, β -*GBP-HDL* 基因表达水平显著降低。人工感染实验结果显示, WSSV 感染 14 d 后,0.2%和 0.5%免疫组对虾的存活率分别为 48.89%和 87.78%,均显著高于对照组(存活率为 0),且 0.5%免疫组对虾存活率显著高于 0.2%免疫组。特异性卵黄抗体制剂能在一定程度上改变发病的进程,延迟对虾的发病和死亡时间,提高同期存活率。研究表明,口服特异性卵黄抗体制剂可以调节对虾肝胰腺免疫酶活力和免疫基因表达水平,显著提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力。本研究为卵黄抗体抗 WSSV 感染机制的研究提供了参考,也为在生产上使用卵黄抗体防控 WSSV 感染提供了科学依据。

关键词 卵黄抗体; 凡纳滨对虾; 白斑综合征病毒; 免疫酶活力; 免疫基因表达; 抗病力

中图分类号 S945.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)04-0226-08

* 农业农村部农业国际合作交流项目、国家自然科学基金(31802342)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD39)共同资助 [This work was supported by Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Natural Science Foundation of China (31802342), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39)]. 王仁宝, E-mail: wangrenbaovip@163.com

① 通信作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-04-20, 收修改稿日期: 2021-06-07

白斑综合征是由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的水生动物重大传染病,是我国一类动物疫病。该病自 20 世纪 90 年代初暴发后,给我国蓬勃发展的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)养殖造成了毁灭性打击,并迅速扩散至亚洲、美洲和地中海周边等主要的对虾养殖国家和地区,成为全球性的养殖对虾流行病。WSSV 的宿主范围极广,可感染几乎所有的水生十足目(Decapoda)甲壳类(OIE, 2016)。1997 年起,世界动物卫生组织(OIE)将白斑综合征列入疫病名录,在国际贸易中需进行重点检疫和防控。

近年来,免疫增强剂、中草药、益生菌和水产疫苗等一系列环境友好型的制剂或药物被应用于防治白斑综合征(周进等, 2003; Citarasu, 2009; 孙博超等, 2019)。卵黄抗体(immunoglobulin of yolk, IgY)是鸟类主要的免疫球蛋白,经抗原刺激的母鸡会产生特异性的 IgY,并在卵黄中大量累积。IgY 能与抗原特异性结合,通过中和作用保护机体(Warr *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2011)。IgY 化学性质稳定,生产成本低、收集和纯化过程操作方便,且符合动物福利,作为传统疫苗的替代品已被越来越多地应用于水产养殖疾病防控中。袁雪梅等(2020)研究发现,特异性卵黄抗体对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)弹状病毒具有明显的中和作用。Qin 等(2018)研究发现,特异性卵黄抗体可促进团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的感染。Gao 等(2016)研究发现,特异性卵黄抗体可提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)感染的的能力。在使用特异性卵黄抗体防控白斑综合征方面, Lu 等(2009)研究发现,其制备的 WSSV 卵黄抗体投喂克氏原螯虾(*Procambarus clarkiaii*),可显著降低 WSSV 攻毒后虾的死亡率。Fu 等(2010)研制了 WSSV 卵黄抗体,分析了其生理生化特性,投喂中国明对虾后可显著提高 WSSV 攻毒对虾的存活率。韦嵩等(2009)研究发现,口服特异性卵黄抗体可提高凡纳滨对虾免疫酶活力,并增强对虾抗 WSSV 感染的能力。但目前的研究多以特异性卵黄抗体的制备、生理生化特性分析和应用效果评价为主,较少涉及卵黄抗体对对虾非特异性免疫功能的影响,尚未见有口服卵黄抗体对 WSSV 感染后对虾免疫酶活力及免疫基因表达水平影响的研究。

本研究将不同剂量的 WSSV 卵黄抗体添加到饲料中投喂凡纳滨对虾幼虾,28 d 后用 WSSV 人工感染免疫对虾,测定对虾肝胰腺的免疫酶活力及免疫基因表达水平,以及感染后 14 d 内对虾的存活率,探

讨特异性卵黄抗体对 WSSV 感染对虾的免疫力和免疫保护效果,以期在生产上使用特异性卵黄抗体防控 WSSV 提供依据,也为卵黄抗体抗对虾病毒机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用凡纳滨对虾购自山东日照某水产养殖公司,体色光亮,活力旺盛,食欲良好,无明显病症,平均体重为(1.26±0.10) g。实验对虾养殖在含 150 L 过滤海水的圆柱形塑料桶中,盐度为 30。实验前,参照 Durand 等(2002)的方法,使用实时荧光定量 PCR (qPCR)检测 WSSV,确认为阴性。

实验期间投喂自制饲料。基础饲料配方:鱼粉 35%、豆粕 28%、面粉 26.1%、谷朊粉 2%、鱼油 2%、虾粉 2%、磷脂 1.5%、Ca(H₂PO₄)₂ 1.5%、胆碱 1%、维生素混合物 0.3%、矿物质混合物 0.5%、维生素 C 0.1%。维生素混合物和矿物质混合物的组成见张婷婷等(2017)。在基础饲料配方中分别添加 0.2%和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂,配制成 0.2%和 0.5%免疫组饲料。基础饲料和 2 种免疫组饲料均用小型饲料机制成直径为 3~4 mm、长度为 3~5 mm 的颗粒饲料,置于 55℃鼓风干燥箱中 6 h,烘干后分装,4℃保存。WSSV 卵黄抗体制剂由韩国 AD BIOTECH 有限公司惠赠。

WSSV 人工感染实验所用毒种为患白斑综合征的病虾,由依托于中国水产科学研究院黄海水产研究所的世界动物卫生组织(OIE)白斑综合征参考实验室提供,经 PCR 检测呈 WSSV 强阳性。取病虾头胸部去除肝胰腺后,剪碎、混合作为感染实验用对虾病料,分成小份,-80℃保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 WSSV 卵黄抗体免疫实验 免疫实验开始前,将实验对虾暂养 1 周。待对虾稳定后,选取 480 尾大小均一、活力良好的对虾,随机分为 3 个组(2 个免疫组,1 个对照组),每组 160 尾虾。免疫组分别投喂 0.2%和 0.5%免疫组饲料,对照组投喂基础饲料,持续投喂 28 d。实验期间,连续充气,水温控制在(28±2)℃。每天投喂 3 次,日投喂量约为对虾体重的 5%。24 h 换水 1 次,换水量为养殖水体的 1/3。

1.2.2 WSSV 人工感染实验 免疫实验 28 d 后,对 0.2%免疫组、0.5%免疫组和对照组的对虾进行 WSSV 人工感染实验。每组各取 120 尾对虾,分别随机分入 4 个桶中,每桶 30 尾对虾。通过 WSSV 人工感染预

实验确定本批对虾病料有效感染剂量为 0.07 g/尾。人工感染前 12 h 停食,次日上午投喂-80℃保存的对虾病料。每天记录对虾的死亡情况,及时捞出死虾,使用 qPCR 方法检测濒死对虾体内的 WSSV (Durand *et al.*, 2002)。14 d 后结束人工感染实验,统计各组对虾的存活率,计算 WSSV 卵黄抗体对凡纳滨对虾的相对免疫保护率(relative percentage of survival, RPS)。感染实验期间,养殖管理同 1.2.1,各实验组继续投喂相应的免疫饲料或基础饲料。

1.2.3 肝胰腺样品的采集 人工感染 3 d 后,每个实验组各取 3 尾对虾,取肝胰腺组织分成 2 份,置于液氮中速冻,然后,转移至-80℃冰箱中保存,分别用于测定免疫酶活力和免疫基因表达水平。

1.2.4 肝胰腺免疫酶活力测定 准确称取各实验组肝胰腺组织,加入等质量的预冷 0.85% NaCl 溶液,混合后用组织研磨器 6000~8000 r/min 匀浆。然后加入 9 倍质量的预冷 0.85% NaCl 溶液,混匀后,4℃ 2700 r/min 离心 5 min,取上清液进行检测。

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,分别测定样品的酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)活力及总蛋白浓度,具体操作按试剂盒说明书进行。酚氧化酶(PO)活力测定参考雷质文等(2001)的方法进行,操作步骤:在酶标板中加入 200 μL 的 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸钾盐缓冲液、10 μL 的 0.01 mol/L 的 L-多巴(L-dopa)及 10 μL 肝胰腺上清液,于室温下混匀,在 490 nm 波长下每间隔 2 min 读取吸光值。在本实验条件下,每分钟每克蛋白吸光值增加 0.001 定义为 1 个活力单位(U/g prot)。

1.2.5 肝胰腺免疫基因表达水平测定 使用逆转录实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)方法测定肝胰腺免疫基因表达水平。凡纳滨对虾免疫基因的检测引物信息见表 1。用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 提取对虾肝胰腺样品总 RNA,用 Nanodrop 2000c (Thermo, 美国)测定 RNA 的质量及浓度。采用一步法反转录试剂盒(全式金),按试剂盒说明书合成 cDNA,保存于-20℃备用。

表 1 凡纳滨对虾免疫基因表达水平检测用引物
Tab.1 Primers for detection of immune gene expression level in *L. vannamei*

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'~3')	基因检索号 GenBank No.
<i>Hsp70</i>	Hsp70-F	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	EF495128
	Hsp70-R	GGTCACGTCCAACAGCAAC	
<i>lectin</i>	lectin-F	TCAGAACTGCCTTGCGATCAC	DQ871245
	lectin-R	CACGCCATTTGCTCATCCA	
β -GBP-HDL	β -GBP-F	ACGAGAACCGACAAGAAGTG	AY249858
	β -GBP-R	TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	
β -actin	β -actin-F	CCACGAGACCACCTACAAC	AF300705
	β -actin-R	AGCGAGGGCAGTGATTC	

使用 TaKaRa 公司的 TB Green Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒,以内参基因(β -actin)为参比,测定样品的热休克蛋白 70 基因(*Hsp70*)、凝集素基因(*lectin*)和 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白基因(β -GBP-HDL)的表达水平,具体操作方法参照试剂盒说明书。

PCR 反应总体积为 25 μL,包括 2×TB Green Premix Ex Taq II 12.5 μL, cDNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), DEPC 处理水 9.5 μL。PCR 反应程序: 95℃, 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。

1.2.6 数据处理与分析 对肝胰腺免疫基因表达水平的 RT-qPCR 实验结果,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。采用 SPSS 25.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA),以 Duncan's 多重比较进行不同处理间的显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 WSSV 感染凡纳滨对虾的肝胰腺免疫酶活力

用 WSSV 卵黄抗体免疫 28 d 后,采用投喂的方式,使用含 WSSV 的对虾病料对各实验组凡纳滨对虾进行人工感染。感染 3 d 后,各组凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活力测定结果显示,0.2%和 0.5%免疫组 SOD 活力均显著高于对照组($P < 0.05$),0.2%和 0.5%免疫组差异不显著(图 1A)。0.2%免疫组 PO 活力显著高于 0.5%免疫组和对照组($P < 0.05$),0.5%免疫组与对照组差异不显著(图 1B)。0.2%免疫组和 0.5%免疫组 ACP 和 AKP 活力均显著低于对照组($P < 0.05$),0.2%免疫组和 0.5%免疫组差异不显著(图 1C、图 1D)。

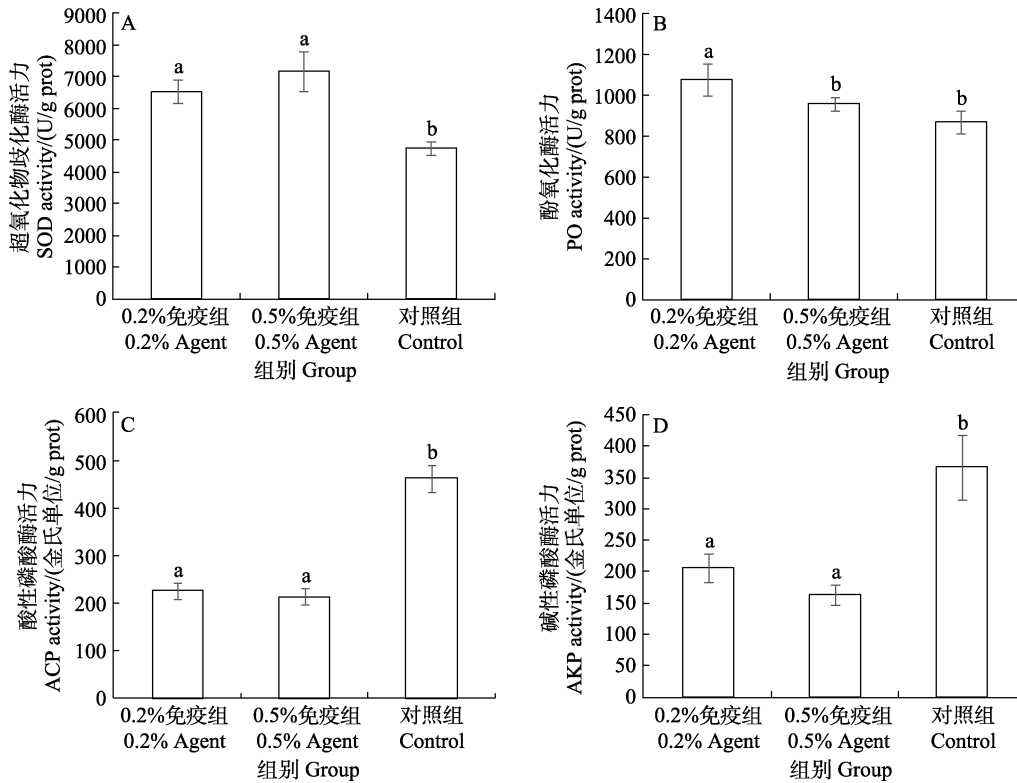


图 1 WSSV 卵黄抗体制剂对人工感染后凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活力的影响

Fig.1 Effects of WSSV IgY agent on the activity of immune enzymes in the hepatopancreas of *L. vannamei* after WSSV infection

同一免疫酶不同字母代表差异显著($P<0.05$)。

Different letters in the same immune enzyme mean significant difference ($P<0.05$).

2.2 WSSV 感染凡纳滨对虾的肝胰腺免疫基因表达水平

经 WSSV 卵黄抗体免疫 28 d, 再用含 WSSV 的对虾病料人工感染 3 d 后, 各组凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平测定结果显示, 0.2% 和 0.5% 免疫组 *Hsp70* 表达水平均显著高于对照组 ($P<0.05$), 且 0.5%

免疫组显著高于 0.2% 免疫组 ($P<0.05$) (图 2A)。0.5% 免疫组和对照组 *lectin* 表达水平均显著高于 0.2% 免疫组 ($P<0.05$) (图 2B)。0.2% 和 0.5% 免疫组 β -GBP-HDL 表达水平均显著低于对照组 ($P<0.05$), 且 0.5% 免疫组显著低于 0.2% 免疫组 (图 2C) ($P<0.05$)。

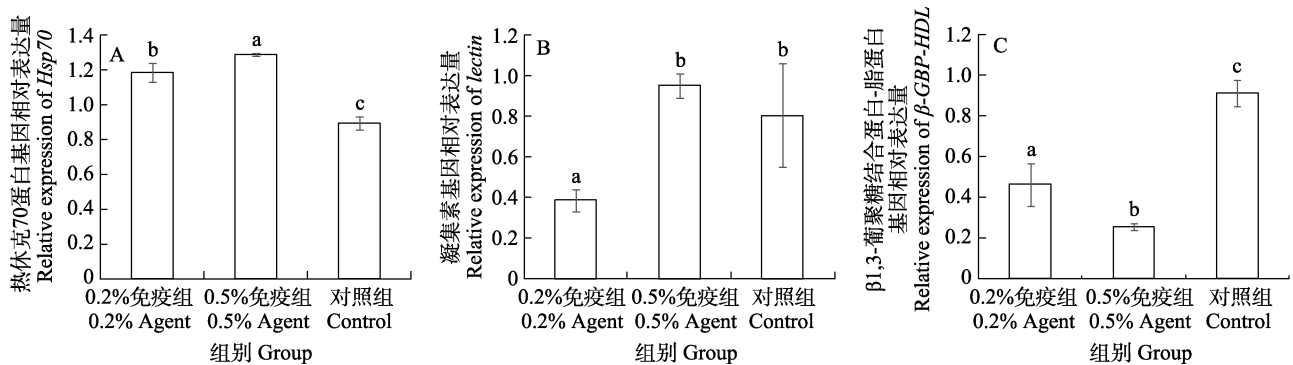


图 2 WSSV 卵黄抗体制剂对人工感染后凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平的影响

Fig.2 Effects of WSSV IgY agent on the expression of immune genes in the hepatopancreas of *L. vannamei* after WSSV infection

同一基因不同字母代表差异显著($P<0.05$)。

Different letters in the same immune gene mean significant difference ($P<0.05$).

2.3 WSSV 感染凡纳滨对虾的存活率

用含 WSSV 卵黄抗体制剂的饲料投喂 28 d 后, 使用含 WSSV 的对虾病料对各实验组凡纳滨对虾进行人工感染。感染后第 2 天, 对照组对虾即开始大量死亡, 死亡率为 15.73%; 而 0.2% 免疫组对虾仅有极少量死亡, 死亡率为 2.22%, 0.5% 免疫组对虾无死亡。感染后的第 7 天, 对照组对虾全部死亡, 此时, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的累积死亡率分别为 32.22% 和 3.33%, 均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。感染后的前 10 d, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的存活率差异不显著, 但均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。感染后第 11—14 天, 0.2% 免疫组对虾仍持续死亡, 而 0.5% 免疫组对虾几乎不再死亡, 此时, 0.5% 免疫组存活率显著高于 0.2% 免疫组 ($P < 0.05$) (图 3)。

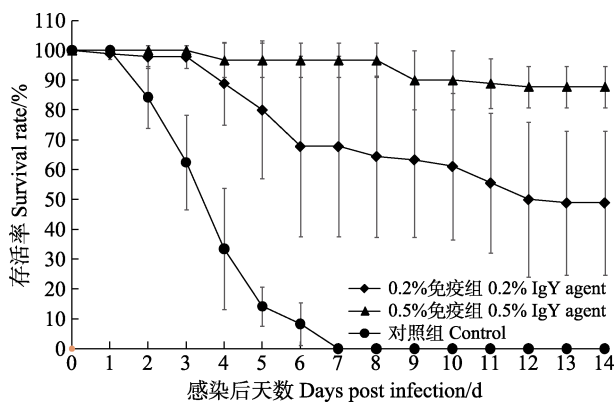


图 3 WSSV 投喂感染后各组凡纳滨对虾的存活率

Fig.3 Survival rate of *L. vannamei* after WSSV infection

WSSV 投喂感染前及感染期间, 0.2% 和 0.5% 免疫组分别投喂添加有 0.2% 和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂的饲料, 对照组投喂基础饲料。

Before and during WSSV infection, the 0.2% and 0.5% IgY agent groups were fed diet containing 0.2% and 0.5% WSSV IgY agent, respectively. The control group was fed basic diet.

人工感染实验结束时(攻毒后第 14 天), 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的存活率分别为 48.89% 和 87.78%, 均显著高于对照组(存活率为 0) ($P < 0.05$), 且 0.5% 免疫组显著高于 0.2% 免疫组 ($P < 0.05$)。添加 0.2% 和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾的相对免疫保护率分别为 48.89% 和 87.78%。死亡对虾的 WSSV qPCR 检测结果均呈强阳性。显然, WSSV 卵黄抗体制剂能够在一定程度上改变疾病的历程, 延迟对虾的发病和死亡时间, 提高同期存活率, 显著提高凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的能力。

3 讨论

3.1 特异性卵黄抗体对感染 WSSV 对虾的肝胰腺免疫酶活力的影响

对虾的免疫系统以非特异性为主, 主要包括细胞免疫和体液免疫。细胞免疫包括血细胞的吞噬、包裹化及结节的形成, 而体液免疫则包括酚氧化酶原激活系统、凝集素的凝集作用、溶血素的产生和一系列抗菌肽和抗病毒多肽的形成 (Bachere *et al*, 2004; Vazquez *et al*, 2009)。ACP、AKP、SOD、PO 是对虾体内重要体液免疫因子, 其在抵抗 WSSV 的过程中具有重要作用 (韦嵩等, 2009; Kumaran *et al*, 2018)。陈辉辉等 (2017) 先用复方中草药投喂凡纳滨对虾, 再用 WSSV 攻毒, 0—96 h 内对虾的 AKP 和 ACP 活力呈先上升后下降的趋势。本研究结果显示, 使用 WSSV 攻毒 3 d 后, 0.2% 和 0.5% 免疫组对虾的 ACP 和 AKP 活力均显著低于对照组, 与上述研究结果相一致。推测该现象可能与 WSSV 感染后对虾为抵御病毒入侵而进行免疫调节有关。韦嵩等 (2009) 研究口服 WSSV 卵黄抗体后、使用 WSSV 攻毒前凡纳滨对虾血清的免疫酶活力, 结果表明, WSSV 卵黄抗体可提高凡纳滨对虾血清的 PO 和 SOD 活力, 增强对虾抗 WSSV 的能力。但上述研究缺少 WSSV 攻毒后凡纳滨对虾免疫酶活力的数据, 也未测定对虾免疫相关基因表达水平的变化。本研究测定了 WSSV 攻毒后免疫凡纳滨对虾的免疫力数据, 为深入分析特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的免疫保护机制提供了参考。Rajesh Kumar 等 (2008) 使用 DNA 疫苗免疫斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 免疫组对虾的 PO 和 SOD 活力显著升高, 攻毒后, 免疫组对虾存活率显著高于对照组, 推测这些免疫因子可能参与抵抗 WSSV。本研究也发现, 0.2% 和 0.5% 免疫组的 SOD 活力均显著高于对照组, 0.2% 免疫组 PO 活力显著高于 0.5% 免疫组和对照组。这表明 WSSV 卵黄抗体有效激活了凡纳滨对虾的抗氧化防御系统, 提高了机体吞噬和清除病原体的能力, 从而增强了对虾的抗病毒能力。

3.2 特异性卵黄抗体对感染 WSSV 对虾的肝胰腺免疫基因表达水平的影响

热休克蛋白 70 在甲壳类动物天然免疫和应对病原体感染中发挥着重要作用 (Pockley *et al*, 2008), *Hsp70* 表达水平与应激耐受能力呈正相关 (张红波等, 2009)。王春迪等 (2016) 研究表明, 在水体中添加蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) PC46 可提高凡纳滨对虾抗

WSSV 感染能力, 益生菌处理组的 *Hsp70* 表达量在 WSSV 感染后呈显著上调趋势。与上述研究类似, 本研究中, 0.2%和 0.5%免疫组 *Hsp70* 表达水平均显著高于对照组, 表明 WSSV 卵黄抗体能提高对虾抗 WSSV 的能力。凝集素在对虾抵御细菌和病毒感染方面发挥着重要作用, 可作为对虾抗病毒和细菌感染的潜在生物标志物(Liu *et al*, 2007)。Ma 等(2007)研究发现, 凡纳滨幼虾感染 WSSV 后, 肝胰腺中的 *lectin* 表达水平相比于对照组在最初的 2 h 下降, 4 h 后升到更高的水平。本研究中, 0.5%免疫组 *lectin* 表达水平高于对照组, 但差异不显著; 0.2%免疫组 *lectin* 表达水平显著低于对照组。推测 WSSV 卵黄抗体可以调节 *lectin* 的表达水平, 其具体调节机制还需进一步研究。 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白在激活酚氧化酶原系统和凝结过程中起着重要作用, 是甲壳动物对抗病毒感染的一个重要免疫因子。本研究结果显示, WSSV 攻毒后, 0.2%和 0.5%免疫组 β -GBP-HDL 基因的相对表达水平均显著低于对照组, 与 ACP 和 AKP 活力具有相似的变化趋势。推测虾体感染病毒后, 这些免疫因子在抗原识别和免疫系统激活阶段发挥作用, 因过度消耗而下降, 但仍需进一步研究口服 WSSV 卵黄抗体后对虾免疫因子的动态变化予以证实。

3.3 特异性卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 WSSV 感染的保护效果

研究表明, 口服 0.05%~1% WSSV 卵黄抗体均可显著提高虾类抗 WSSV 感染的能力(Lu *et al*, 2009; Fu *et al*, 2010; 韦嵩等, 2009)。本研究结果显示, 添加 0.2%和 0.5% WSSV 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾均有显著的保护作用, 其相对免疫保护率分别为 48.89%和 87.78%, 0.5%添加量的保护效果更好。此外, 本研究发现, 使用 WSSV 卵黄抗体免疫凡纳滨对虾, 还能在一定程度上改变白斑综合症的发病进程, 延迟免疫对虾的发病和死亡时间, 提高同期存活率, 这与韦嵩等(2009)的研究结果相类似。推测卵黄抗体具有双重抗病机制, 一方面可以与病原特异性结合, 起到中和特定病原的作用(Gadde *et al*, 2015); 另一方面可以刺激非特异性免疫系统, 增强机体的抗病能力(Zhen *et al*, 2008)。由此可见, 特异性卵黄抗体可有效地用于动物的被动免疫, 在疾病控制方面具有极大的潜力。

综上所述, 本研究报道了口服特异性卵黄抗体对 WSSV 感染后的对虾肝胰腺中的 4 种免疫酶活力和 3 种免疫基因表达水平的影响, 表明在饲料中添加 WSSV 卵黄抗体制剂, 可增强凡纳滨对虾的非特异性免疫机

能和抗 WSSV 感染的能力, 显著提高感染对虾的存活率。研究结果为卵黄抗体抗 WSSV 感染机制的研究提供了参考, 也为在生产上使用卵黄抗体防控 WSSV 感染提供了科学依据。特异性卵黄抗体作为一种环境友好的新型免疫制剂能激活和调节凡纳滨对虾免疫系统, 在防控对虾白斑综合征方面具有极大的潜在价值。

致谢: 本研究使用的自制对虾饲料由中国水产科学研究院黄海水产研究所梁萌青老师协助制作, 人工感染用对虾病料由中国水产科学研究院黄海水产研究所杨冰老师提供, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- BACHERE E, GUEGUEN Y, GONZALEZ M, *et al*. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: The penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 149-168
- CHEN H H, TU C L, TANG Y, *et al*. Effects of compound Chinese herbs on immune activities of *Litopenaeus vannamei* after infected with white spot syndrome virus. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2017, 56(5): 686-692 [陈辉辉, 涂晨凌, 唐杨, 等. 复方中草药对白斑综合征病毒感染下凡纳滨对虾免疫活性的影响. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2017, 56(5): 686-692]
- CITARASU T. Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 2009, 18(3): 403-414
- DURAND S V, LIGHTNER D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(7): 381-389
- FU L L, WANG Y B, LI J R, *et al*. Protection of *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck, 1765) against the white spot syndrome virus using specific chicken egg yolk immunoglobulins by oral delivery. *Aquaculture Research*, 2010, 41(12): 1806-1816
- GADDE U, RATHINAM T, LILLEHOJ H S. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases - A review. *Animal Health Research Reviews*, 2015, 16(2): 163-176
- GAO X J, ZHANG X J, 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(5): 723
- 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*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 74: 349-362

- LEI Z W, HUANG J, YANG B, *et al.* Immune factors in haemolymph supernatant of *Penaeus chinensis* infected by WSSV. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 46–51 [雷质文, 黄捷, 杨冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 46–51]
- LIU Y C, LI F H, DONG B, *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (*Fclectin*) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 598–607
- LU Y, LIU J, JIN L, *et al.* Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkiaii*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(3): 750
- MA T H T, TIU S H K, HE J G, *et al.* Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Early gene down-regulation after WSSV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(2): 430–437
- OIE. *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*, 7th Edition. Paris: OIE, 2016, 186–199
- QIN Z D, BABU V S, LI N Q, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 78: 26–34
- POCKLEY A G, MUTHANA M, CALDERWOOD S K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 2008, 33(2): 71–79
- RAJESH KUMAR S, ISHAQ AHAMED V P, SARATHI M, *et al.* Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 467–478
- SUN B C, YANG Y K, LI Y H, *et al.* Effects of single or mixed *Bacillus* on WSSV infection and immune-related gene expression in *Litopenaeus vannamei*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(3): 113–121 [孙博超, 杨运楷, 李玉宏, 等. 饲料中添加复合芽孢杆菌对凡纳滨对虾抗病病毒感染能力及抗病基因表达的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(3): 113–121]
- VAZQUEZ L, ALPUCHE J, MALDONADO G, *et al.* Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 2009, 15(3): 179–188
- WANG C D, SONG X L, ZHANG X J, *et al.* Effects of adding *Bacillus cereus* PC465 to rearing water on disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(1): 146–155 [王春迪, 宋晓玲, 张晓静, 等. 养殖水体中添加蜡样芽孢杆菌 PC465 对凡纳滨对虾抗病力的影响. *中国水产科学*, 2016, 23(1): 146–155]
- WARR G W, MAGOR K E, HIGGINS D A. IgY: Clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*, 1995, 16(8): 392–398
- WEI S, SONG X L, LI H B, *et al.* Effects of Ig-guard (shrimp) on immunity-related enzyme activities and WSSV resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 112–118 [韦嵩, 宋晓玲, 李海兵, 等. 白斑综合症病毒卵黄抗体对凡纳滨对虾免疫相关酶活力和抗病毒能力的影响. *水产学报*, 2009, 33(1): 112–118]
- 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. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 860–868
- YUAN X M, LÜ S J, SHI W D, *et al.* Isolation and egg-yolk antibody preparation of *Micropterus salmonides* rhabdovirus. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 151–157 [袁雪梅, 吕孙建, 施伟达, 等. 大口黑鲈弹状病毒的分离培养及其卵黄抗体的制备. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 151–157]
- ZHANG H B, WAN Y T, WANG L Z, *et al.* The protection and regulation of *Hsp70* in cellular stress response. *China Practical Medicine*, 2009, 14(4): 228–229 [张红波, 万亚涛, 王莲哲, 等. 在细胞应激反应中 HSP70 的保护与调节作用. *中国实用医药*, 2009, 14(4): 228–229]
- ZHANG T T, CHEN X R, LIANG M Q, *et al.* Effects of different protein hydrolysates on growth performance and non-specific immunity of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(3): 96–105 [张婷婷, 陈效儒, 梁萌青, 等. 不同蛋白水解物对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)生长性能及非特异性免疫的影响. *渔业科学进展*, 2017, 38(3): 96–105]
- ZHEN Y H, JIN L J, GUO J, *et al.* Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 126–133
- ZHOU J, HUANG J, SONG X L. Applications of immunostimulants in aquaculture. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(4): 70–79 [周进, 黄捷, 宋晓玲. 免疫增强剂在水产养殖中的应用. *海洋水产研究*, 2003, 24(4): 70–79]

Protective Effects of Oral Specific Egg Yolk Immunoglobulins (IgY) against White Spot Syndrome Virus (WSSV) Infection in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

WANG Renbao^{1,2}, WANG Yiting^{1,3}, ZHANG Huifen^{1,3}, SONG Xiaoling¹,
WAN Xiaoyuan¹, XIE Guosi¹, SHI Chengyin¹①

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao),

Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Qingdao, Shandong 266071, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract The aim of this study was to explore the immunoprotective mechanism and protective effects of oral specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV) infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Different doses of WSSV IgY agent (0, 0.2%, and 0.5%) were added to shrimp feeds and administered to juvenile *L. vannamei* for 28 days. The survival rate of juveniles was measured within 14 days of artificial infection with WSSV. The activity of immune enzymes and the relative expression levels of immune genes in shrimp hepatopancreas were measured after 3 days of WSSV infection. The results showed that compared with the control group without IgY, the 0.2% IgY agent group showed significantly higher enzyme activity by superoxide dismutase (SOD) and phenoloxidase (PO), and significantly lower enzyme activity by acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP). The relative expression level of heat shock protein 70 gene (*Hsp70*) also significantly increased, while the relative expression levels of lectin gene (*lectin*) and β -1,3-glucan binding protein-lipoprotein gene (β -*GBP-HDL*) significantly decreased in the 0.2% IgY agent group. SOD activity significantly increased while PO activity did not change significantly, while ACP and AKP activities decreased in the 0.5% IgY agent group. The relative expression level of *Hsp70* also significantly increased, and the relative expression level of *lectin* did not significantly change, while the relative expression level of β -*GBP-HDL* significantly decreased in the 0.5% IgY agent group. The artificial infection results showed that after 14 days of WSSV infection, the survival rates of shrimp in the 0.2% and 0.5% IgY agent groups, and the control group were 48.89%, 87.78%, and 0, respectively. The survival rate of shrimp in the 0.2% and 0.5% IgY agent groups was significantly higher than that in the control group, and the survival rate of shrimp in the 0.5% IgY agent group was also significantly higher than that in the 0.2% IgY agent group. Specific IgY agents can change the course of a disease, delay disease onset and death of immune shrimp, and significantly improve the survival rate of shrimp over a certain period. The results showed that oral specific IgY agents could affect the activity of immune enzymes and the expression level of immune genes in the hepatopancreas of *L. vannamei*, significantly improving their ability to resist WSSV infection. This study provides a basis for the application of IgY agents in the prevention and control of WSSV infection, and also provides a reference for research on the anti-WSSV infection mechanism of IgY agents.

Key words Immunoglobulin of yolk (IgY); *Litopenaeus vannamei*; White spot syndrome virus (WSSV); Immune enzyme activity; Immune gene expression; Disease resistance

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn