



卵黄抗体对凡纳滨对虾生长、免疫及抗 Vp_{AHPND} 感染的影响

王仁宝^{1,2}, 史成银^{2*}, 宋晓玲², 王一婷^{2,3}, 张惠芬^{2,3},
任宁欣^{1,2}, 谢国驹², 张庆利²

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 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;

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抗致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease, Vp_{AHPND}) 感染的效果及其机制, 防控对虾急性肝胰腺坏死病, 本实验以添加不同剂量 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂 (0、0.2% 和 0.5%) 的饲料投喂凡纳滨对虾幼虾, 测定对虾的生长率和存活率、对虾肝胰腺免疫酶活性和免疫基因相对表达水平, 通过浸浴感染实验测定免疫对虾抗 Vp_{AHPND} 感染的能力。生长实验结果显示, 免疫 28 d 后, 免疫组与未添加卵黄抗体制剂的对照组对虾在平均生长速率、特定生长速率和存活率方面均无显著性差异。免疫功能结果显示, 免疫 14 d 后, 与对照组相比, 0.2% 免疫组对虾肝胰腺的酚氧化酶 (PO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LZM) 活性显著升高, 抗菌肽 (Crustin) 基因的相对表达水平也显著升高, 而 β -1,3-葡聚糖结合蛋白—脂蛋白 (β -GBP-HDL) 基因的相对表达水平则显著降低。浸浴感染实验结果显示, 0.2% 免疫组对虾的存活率显著高于对照组; 0.2% Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾的相对免疫保护率为 63.77%。研究表明, 口服卵黄抗体不会对凡纳滨对虾的生长和存活产生不良影响, 0.2% 的 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂通过提升凡纳滨对虾的 PO、SOD、LZM 活性和抗菌肽基因的表达水平, 增强凡纳滨对虾的免疫功能, 从而提高对虾抗 Vp_{AHPND} 感染的能力, 具有很强的应用潜力。本研究为使用特异性卵黄抗体防控 AHPND 提供了依据, 也为其作用机制研究提供了参考。

关键词: 凡纳滨对虾; 卵黄抗体; 生长性能; 急性肝胰腺坏死病; 免疫应答; 基因表达

中图分类号: S 945.1

文献标志码: A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是世界主要的养殖对虾种类, 长期占据甲壳类养殖产量的首位, 2018 年养殖产量接近 500 万 t, 约占全球甲壳类养殖总产量的 50%^[1]。随着高密度集约化养殖模式的推广和养殖规模的剧增, 凡纳滨对

虾养殖生产的病害问题日益严重^[2-3]。急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 是一种细菌性传染疾病, 主要感染凡纳滨对虾和斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[4]。该病主要由致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (*Vibrio*

收稿日期: 2021-02-03 修回日期: 2021-03-12

资助项目: 农业农村部国际合作交流项目; 国家自然科学基金 (31802342); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD39)

第一作者: 王仁宝 (照片), 从事鱼虾免疫和病原学研究, E-mail: wangrenbaovip@163.com

通信作者: 史成银, 从事海水养殖生物病害防控研究, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn



parahaemolyticus associated with acute hepatopancreatic necrosis disease, Vp_{AHPND}) 引起, 该菌株携带一种大小约 70 kb、可编码 2 种毒力蛋白 (PirA 和 PirB) 的质粒 pVA1^[5-6]。自 2010 年以来, 该病在全球范围内暴发, 每年给全球对虾养殖业造成的直接经济损失超过 10 亿美元。2015 年起, 世界动物卫生组织 (OIE) 将 AHPND 列入疫病名录, 须在国际上进行检疫和疫情通报^[4]。

鉴于 AHPND 给全球对虾养殖造成的严重损害, 有效预防和控制该病一直是国际上热门的研究课题。抗生素通常被用来控制水产养殖中有害细菌引起的疾病, 也被用于治疗 AHPND^[7]。然而引起 AHPND 的弧菌包括副溶血性弧菌很多已被证明具有抗药性^[8-10], 因此其效果并不显著。此外, 抗生素残留物还会不断地在环境和动物体内累积^[11], 最终会对人类健康构成威胁。作为抗生素的替代品, 免疫刺激剂、益生菌、中草药、噬菌体疗法和生态修复等替代策略被相继被用于 AHPND 的防治^[12-16]。但是这些策略仅通过提高宿主免疫力来达到清除或杀灭入侵病原体的目的, 而不能特异性针对某种特定病原, 往往作用效果有限。

卵黄抗体 (immunoglobulin of yolk, IgY) 是禽类经特定抗原刺激后, 由 B 淋巴细胞产生的积聚在卵黄中的特异性免疫球蛋白, 具有较好的中和特定病原的作用^[17-18]。卵黄抗体具有类似哺乳动物 IgG 的免疫活性, 能与抗原特异性识别结合, 并且理化性质稳定, 特异性强, 不产生耐药性, 对肠道正常的菌群无副作用。近年来, 卵黄抗体作为抗生素替代品或饲料添加剂已被广泛用于畜禽疾病的防治, 在水产方面也表现出较好的被动免疫效果^[19]。在鱼类方面, 有研究报道卵黄抗体可以保护团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 抵抗嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的感染^[20], 或促进赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 抵抗神经坏死病毒的感染^[21]。在虾类方面, Kumaran 等^[22]报道了卵黄抗体可以提高印度明对虾 (*Fenneropenaeus indicus*) 抗哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 的感染。近年来, 一些相关文献也报道了卵黄抗体在抗副溶血性弧菌方面的应用。Nakamura 等^[23]用重组表达的 PirA 蛋白免疫蛋鸡, 制备了含特异性卵黄抗体的蛋粉并添加到对虾饲料中, 投喂 3 d 后即可显著提高凡纳滨对虾苗抗 Vp_{AHPND} 感染的能力; 将抗 Vp_{AHPND} 的特异性卵黄抗体应用于对虾育苗生产, 证明卵黄抗体对凡纳滨对虾幼体具有保护

效果^[24]。上述研究表明, 特异性卵黄抗体可以提高对虾幼体抗 AHPND 感染的能力。然而, 这些研究主要集中在特异性卵黄抗体的制备、生理生化特性, 以及凡纳滨对虾育苗阶段的应用等方面, 还未见有对虾养殖阶段特异性卵黄抗体抗 AHPND 应用效果及其抑菌机制的研究。

本实验将 Vp_{AHPND} 卵黄抗体添加到对虾饲料中, 通过投喂的方式免疫凡纳滨对虾, 分析了卵黄抗体对养殖期凡纳滨对虾生长及存活的影响; 通过对虾肝胰腺相关免疫酶活性及重要免疫基因表达水平的测定, 分析了卵黄抗体对凡纳滨对虾免疫性能的影响; 通过浸浴感染实验, 评价了其抗 Vp_{AHPND} 感染的效果, 以期使用特异性卵黄抗体防控 AHPND 提供依据, 也为其作用机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 凡纳滨对虾及其养殖管理

凡纳滨对虾购自山东日照某水产养殖公司 (体长为 4.0~5.6 cm), 养殖在含 150 L 过滤海水的圆柱形塑料桶中。实验期间连续充气, 水温控制在 (28±2) °C。每天投喂 3 次, 日投喂量约为对虾体质量的 5%。24 h 换水 1 次, 换水量为养殖水体的 1/3。实验前参照 Han 等^[25]提供的实时荧光定量 PCR (qPCR) 方法检测 Vp_{AHPND} , 结果为阴性。

1.2 对虾饲料及 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂

实验期间投喂自制饲料。基础饲料配方: 鱼粉 35%, 谷朊粉 2%, 豆粕 28%, 面粉 26.1%, 磷脂 1.5%, 胆碱 1%, 鱼油 2%, 虾粉 2%, 磷酸二氢钙 1.5%, 维生素 0.3%, 矿物质 0.5%, 维生素 C 0.1%。在基础饲料配方中分别添加 0.2%、0.5% Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂制成免疫饲料。 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂由韩国 ADBIOTECH Co., Ltd. 惠赠。基础饲料和免疫饲料均用小型饲料机制成颗粒饲料, 在 55 °C 条件下 6 h 烘干, 分装后 4 °C 保存。

1.3 Vp_{AHPND} 卵黄抗体免疫实验

实验对虾暂养 7 d 后, 选取 480 尾大小均匀、活力良好的对虾, 随机分为 3 个组 (2 个免疫组和 1 个对照组), 每组 4 个桶, 每桶 40 尾虾。免疫组分别投喂添加 0.2% 和 0.5% Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂的免疫饲料 (分别记为 0.2% 免疫组和 0.5% 免疫组), 对照组投喂不含 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂的

基础饲料, 持续投喂 28 d。

1.4 对虾生长指标的测定

分别在免疫实验的第 0、28 天, 每组各取 20 尾对虾快速称重, 计算平均生长速率和特定生长速率。在免疫实验的第 28 天, 记录各组对虾存活数, 计算存活率。计算公式:

平均生长速率 (average growth rate, AGR) (%/d) = (末体质量 - 初体质量) / (初体质量 × 养殖天数) × 100%

特定生长速率 (specific growth rate, SGR) (%/d) = [ln(末体质量) - ln(初体质量)] / (养殖天数) × 100%

存活率 (survival rate, SR) (%) = 存活尾数 / 总尾数 × 100%

1.5 肝胰腺样品采集及处理

在免疫实验第 21 天, 每组各取 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 °C 冰箱中保存, 分别用于测定免疫酶活性和免疫基因表达水平。

1.6 肝胰腺免疫酶活性测定

对采集的肝胰腺组织称重, 加入等质量的预冷 0.85% 氯化钠溶液, 用组织研磨器 6 000~8 000 r/min 匀浆。然后加入 9 倍质量的预冷 0.85% 氯化钠溶液, 混匀后 4 °C 2 700 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出品的试剂盒, 分别测定样品的超氧化物歧化酶 (SOD)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性及总蛋白浓度, 具体操作按试剂盒说明书进行。酚氧化酶 (PO) 活性测定参照雷质文等^[26]改进 Ashida 的方法。

主要步骤: 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)。溶菌酶 (LZM) 活力测定参照韦蒿等^[27]的方法并略加改动。主要步骤: 以溶壁微球菌冻干粉 (南京建成生物工程研究所) 为底物, 按说明书配制应用菌液。在酶标板中加入 190 μL 应用菌液及 10 μL 肝胰腺上清液, 于室温下混匀, 在 570 nm 波长下测量吸光值 A_0 , 移入 37 °C 水浴中作用 30 min 后, 立即冰水浴 10 min 终止反应, 测吸光值 A 。LZM 活性 = $(A_0 - A) / A$ 。

1.7 RNA 提取及 cDNA 合成

用 QIAGEN RNeasy Mini Kit 提取样品总 RNA, 用 Nanodrop 2000c (Thermo, 美国) 测定 RNA 浓度。采用北京全式金生物技术有限公司生产的一步法反转录试剂盒, 按试剂盒说明书合成 cDNA, 保存于 -20 °C 备用。

1.8 肝胰腺免疫基因表达水平测定

使用 TaKaRa 公司的 TB Green Premix Ex Taq II qPCR 试剂盒, 以 β -actin 为内参基因, 测定样品的 β -1,3-葡聚糖结合蛋白-脂蛋白 (β -GBP-HDL)、热休克蛋白 70 (Hsp70)、凝集素 (Lectin)、抗菌肽 (Crustin) 等免疫因子基因的表达水平, 具体操作方法参照试剂盒说明书。凡纳滨对虾免疫基因的检测引物名称及序列见表 1。

PCR 反应总体系 (25 μL): TB Green Premix

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 genes	引物名称 primers	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')	基因登录号 GenBank no.
β -GBP-HDL	β -GBP-F	ACGAGAACGGACAAGAAGTG	AY249858
	β -GBP-R	TTCAGCATAGAAGCCATCAGG	
Hsp70	Hsp70-F	CCTCCAGGACTTCTTCAACG	EF495128
	Hsp70-R	GGTCACGTCCAACAGCAAC	
Lectin 基因 Lectin gene	Lectin-F	TCAGAACTGCCTTGCGATCAC	DQ871245
	Lectin-R	CACGCCATTGCTCATCCA	
Crustin 基因 Crustin gene	Crustin-F	ACGAGGCAACCATGAAGG	AG430076
	Crustin-R	AACCACCACCAACACCTAC	
β -actin	β -actin-F	CCACGAGACCACCTACAAC	AF300705
	β -actin-R	AGCGAGGGCAGTGATTTC	

Ex Taq II (2×) 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 °C, 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。对实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量分析。

1.9 Vp_{AHPND} 菌株及感染实验

Vp_{AHPND} 感染实验用副溶血性弧菌 (菌株编号为 20130629002S01), 由中国水产科学研究院黄海水产研究所国家级海洋渔业生物种质资源库分离并保存, 经鉴定带有毒力基因 *pirA_{vp}* 和 *pirB_{vp}*, 确定为致急性肝胰腺坏死病副溶血性弧菌 (Vp_{AHPND})。菌株活化后挑取单菌落接种到添加了 2% NaCl 的 TSB 液体培养基中, 28 °C 恒温振荡培养至 OD₅₈₀ 为 1 (细菌浓度约 2.0×10^9 CFU/mL) 使用。

免疫 28 d 后, 将 0.2%、0.5% 免疫组和对照组的剩余对虾, 每组各取 90 尾, 分别随机分入 3 个桶中, 每桶 30 尾对虾, 采用 Tran 等^[5] 的方法进行感染实验。先通过预实验确定了本批对虾有效感染量为 10^7 CFU/mL。 Vp_{AHPND} 浸浴感染实验的具体做法: 先将对虾浸泡在 2.2×10^7 CFU/mL 的 Vp_{AHPND} 菌液中 15 min, 然后移入含 2.2×10^5 CFU/mL Vp_{AHPND} 的过滤海水中养殖, 24 h 内不换水, 之后按“凡纳滨对虾及其养殖管理”所述进行养殖管理, 各组继续投喂相应的免疫饲料或基础饲料。感染后每天统计各组对虾的死亡情况, 持续观察 14 d。14 d 后结束实验, 计算相对免疫保护率 (relative percentage of survival, RPS,%): $RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

1.10 病理切片分析和致病菌毒力基因检测

Vp_{AHPND} 感染实验期间, 取濒死对虾的肝胰腺置于酸性 Davidson's AFA 固定液中固定 24 h, 按常规方法制作石蜡切片, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H.E) 染色后用 Panoramic MIDI 病理切片扫描仪 (3DHISTECH, 匈牙利) 扫描观察。作为对比, 取未感染 Vp_{AHPND} 的健康凡纳滨对虾肝胰腺组织, 同样制作切片后扫描观察。参照 Han 等^[25] 提供的 qPCR 方法检测感染组濒死对虾体内的致病菌毒力基因 *pirA_{vp}*。

1.11 数据分析与处理

采用 SPSS 25.0 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, $P < 0.05$ 作为差异显著。

2 结果

2.1 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾的生长及存活率的影响

免疫 28 d 后, 各组对虾的平均生长速率、特定生长速率和存活率结果显示, 0.2% 免疫组、0.5% 免疫组和对照组对虾的平均生长速率分别为 $(6.13 \pm 2.28)\%$ 、 $(7.56 \pm 0.85)\%$ 和 $(7.74 \pm 1.04)\%$ 。统计分析显示, 各组之间差异不显著。0.2% 免疫组、0.5% 免疫组和对照组对虾的特定生长速率分别为 $(3.52 \pm 0.85)\%$ 、 $(4.06 \pm 0.28)\%$ 和 $(4.11 \pm 0.33)\%$, 各组之间的差异也不显著。在存活率方面, 0.2% 免疫组最高, 为 $(77.08 \pm 6.48)\%$; 0.5% 免疫组居中, 为 $(73.75 \pm 1.77)\%$; 对照组最低, 仅为 $(66.25 \pm 6.48)\%$ (表 2)。但统计分析显示, 各组之间差异不显著。因此, 口服 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂免疫对凡纳滨对虾的生长和存活无明显影响。

表 2 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾生长和存活率的影响

Tab. 2 Effects of Vp_{AHPND} IgY agent on growth and survival rate of *L. vannamei*

项目 items	组别 groups		
	0.2% 免疫组 0.2% IgY agent	0.5% 免疫组 0.5% IgY agent	对照组 control
平均生长速率/(%/d) average growth rate	6.13±2.28	7.56±0.85	7.74±1.04
特定生长速率/(%/d) specific growth rate	3.52±0.85	4.06±0.28	4.11±0.33
存活率/% survival rate	77.08±6.48	73.75±1.77	66.25±6.48

2.2 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活性的影响

用 Vp_{AHPND} 卵黄抗体免疫 14 d 后, 各组凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活性测定结果显示, 在 PO 活性方面, 0.2% 免疫组显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但与 0.5% 免疫组差异不显著 (图 1-a)。在 SOD 活性方面, 0.2% 免疫组显著高于 0.5% 免疫组与对照组 ($P < 0.05$), 0.5% 免疫组与对照组差异不显著 (图 1-b)。在 LZM 活性方面, 0.2% 免疫组和 0.5% 免疫组均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 同时 0.5% 免疫组还显著高于 0.2% 免疫组 (图 1-c) ($P < 0.05$)。在 ACP、AKP 活性方面, 0.2% 免疫组、0.5% 免疫组和对照组之间差异均不显著 (图 1-d, e)。

2.3 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平的影响

经 Vp_{AHPND} 卵黄抗体免疫 14 d 后, 各组凡纳

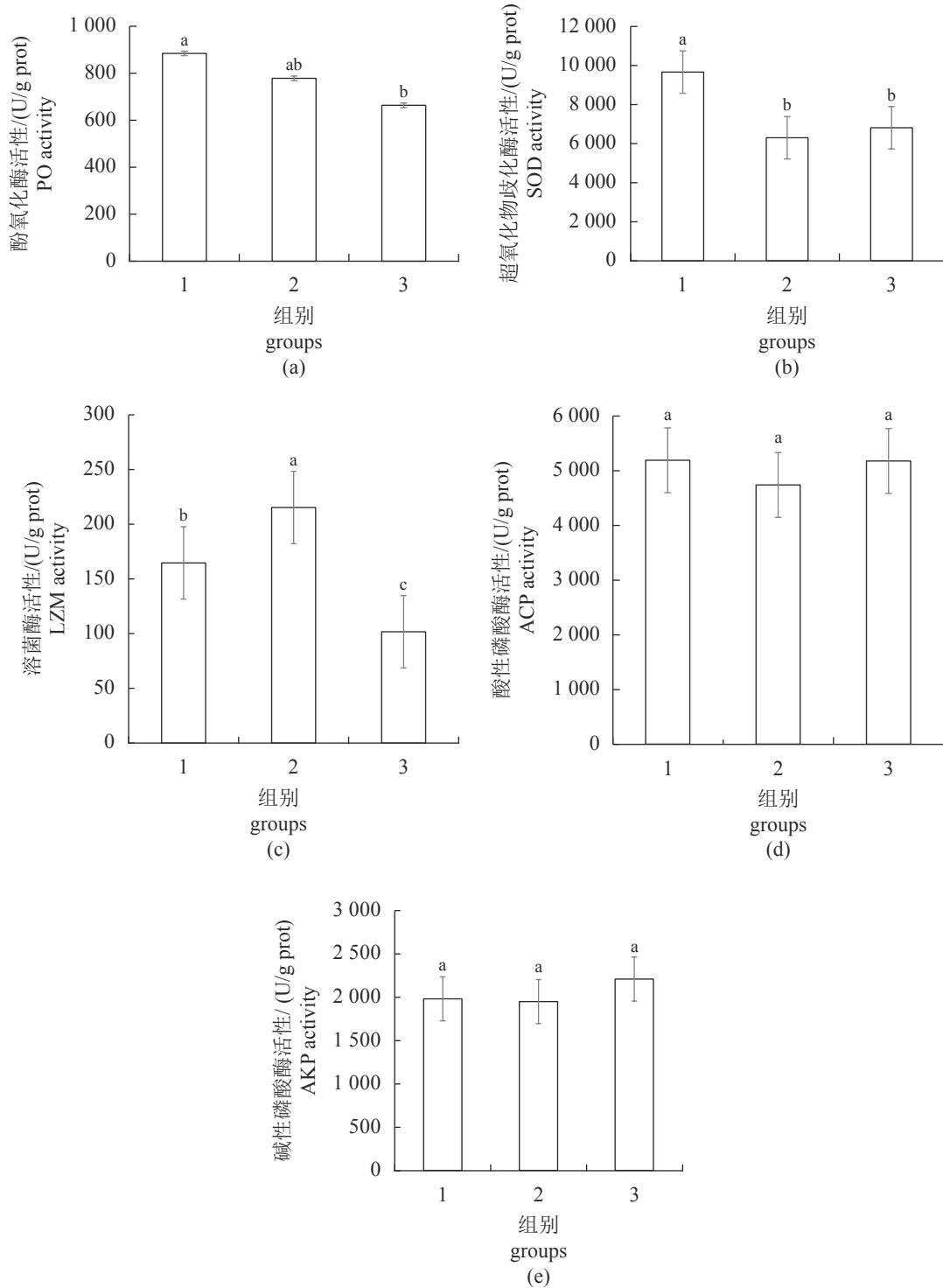


图 1 *Vp*_{AHPND} 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活性的影响

1. 0.2% 免疫组, 2. 0.5% 免疫组, 3. 对照组; 同一免疫酶不同字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 1 Effect of *Vp*_{AHPND} IgY agent on the activity of immune enzymes in the hepatopancreas of *L. vannamei*

1. 0.2% agent, 2. 0.5% agent, 3. control group; different letters in the same immune enzyme mean significant difference ($P < 0.05$); the same below

滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平测定结果显示, 在 Crustin 基因表达水平方面, 0.2% 免疫组显著高于 0.5% 免疫组和对照组 ($P < 0.05$), 分别为

0.5% 免疫组和对照组的 3.06 倍和 2.22 倍; 0.5% 免疫组与对照组差异不显著 (图 2-a)。在 β -GBP-HDL 表达水平方面, 0.2% 免疫组和 0.5% 免疫组

均显著低于对照组 (图 2-b) ($P < 0.05$)。在 *Hsp70* 表达水平方面, 各组之间差异不显著 (图 2-c)。在 Lectin 基因表达水平方面, 0.2% 免疫组略微高于

对照组, 0.5% 免疫组略低对照组, 但各组之间差异均不显著 (图 2-d)。

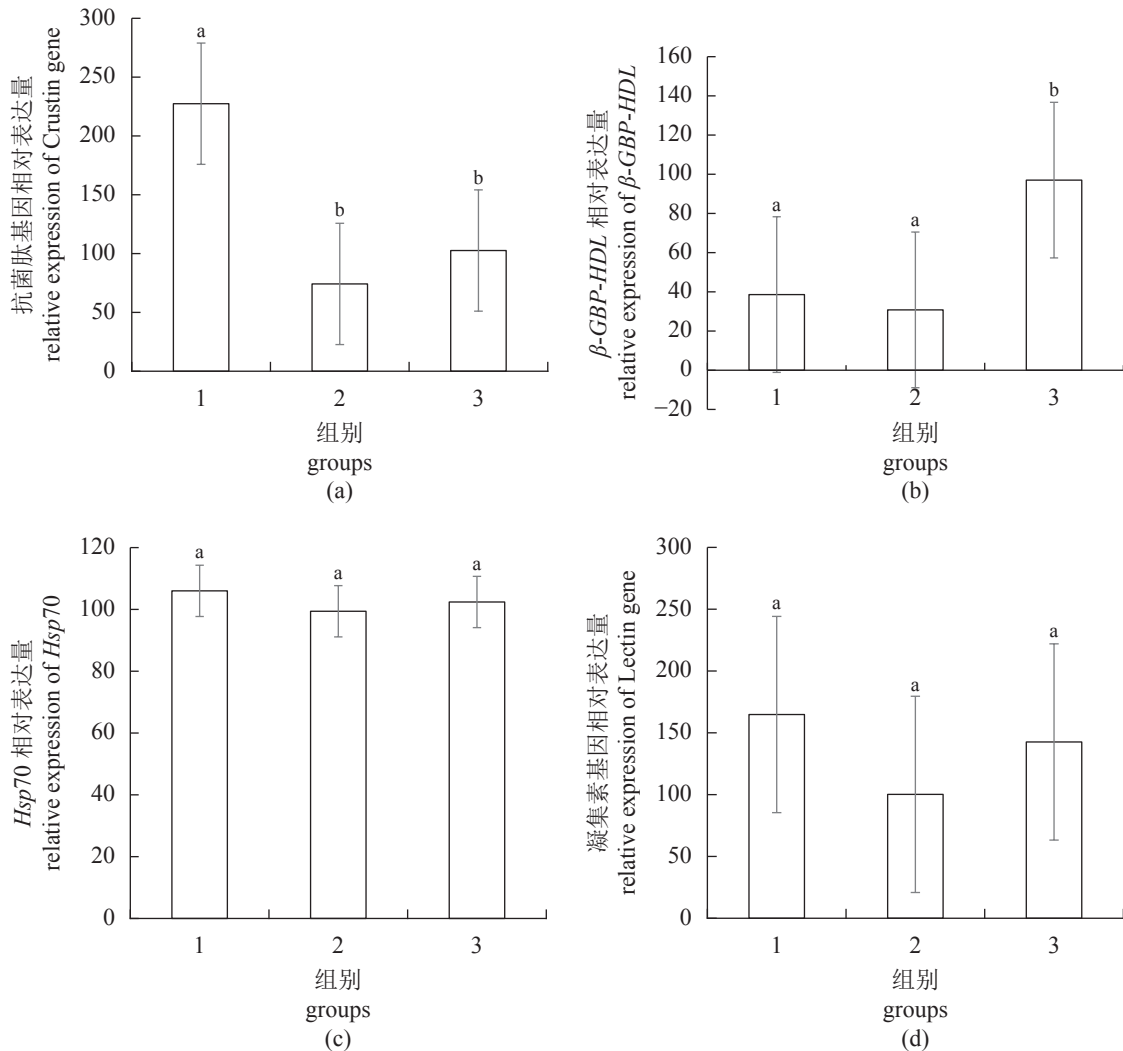


图 2 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平的影响

同一基因不同字母代表存在显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 2 Effect of Vp_{AHPND} IgY agent on the expression of immune genes in the hepatopancreas of *L. vannamei*

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

2.4 Vp_{AHPND} 浸泡感染后凡纳滨对虾存活率

免疫 28 d 后, 采用浸泡感染的方式, 使用 Vp_{AHPND} 病原菌对各实验组凡纳滨对虾进行人工感染。感染后 14 d 内各组对虾的存活率见图 3。感染后的第 1 天, 各组对虾均未出现死亡。感染后的第 2 天, 0.2% 免疫组和 0.5% 免疫组对虾开始少量死亡, 死亡率分别为 3.33% 和 8.89%; 此时对照组对虾开始大量死亡, 死亡率达 37.78%。感染后的第 5 天, 各组对虾死亡情况逐渐稳定, 0.2% 免疫组、0.5% 免疫组和对照组的死亡率分别

为 25.56%、22.22% 和 77.34%。至感染后第 14 天实验结束时, 0.2% 免疫组对虾的存活率为 72.22%, 显著高于对照组的 23.33% ($P < 0.05$); 0.5% 免疫组对虾的存活率为 48.89%, 虽然也高于对照组, 但差异不显著; 与 0.5% 免疫组相比, 0.2% 免疫组对虾的存活率略高, 但差异不显著。添加 0.2% Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾的相对免疫保护率为 63.77%。显然, 适量添加 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂可提高凡纳滨对虾抗 Vp_{AHPND} 感染的能力。

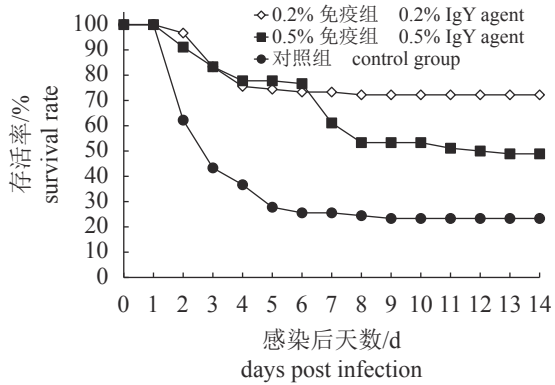


图3 *Vp*_{AHPND} 浸浴感染后各组凡纳滨对虾的存活率曲线

*Vp*_{AHPND} 浸浴感染前及感染期间, 0.2% 免疫组和 0.5% 免疫组分别投喂 28 d 添加有 0.2% 和 0.5% *Vp*_{AHPND} 卵黄抗体制剂的免疫饲料, 对照组投喂基础饲料

Fig. 3 Survival rate curves of *L. vannamei* after immersion infection with *Vp*_{AHPND}

Before and during immersion infection, the 0.2% and 0.5% IgY agent groups were fed the diet containing 0.2% and 0.5% *Vp*_{AHPND} IgY agent for 28 d, respectively; the control group was fed the basic diet

2.5 组织病理分析和致病菌毒力基因检测

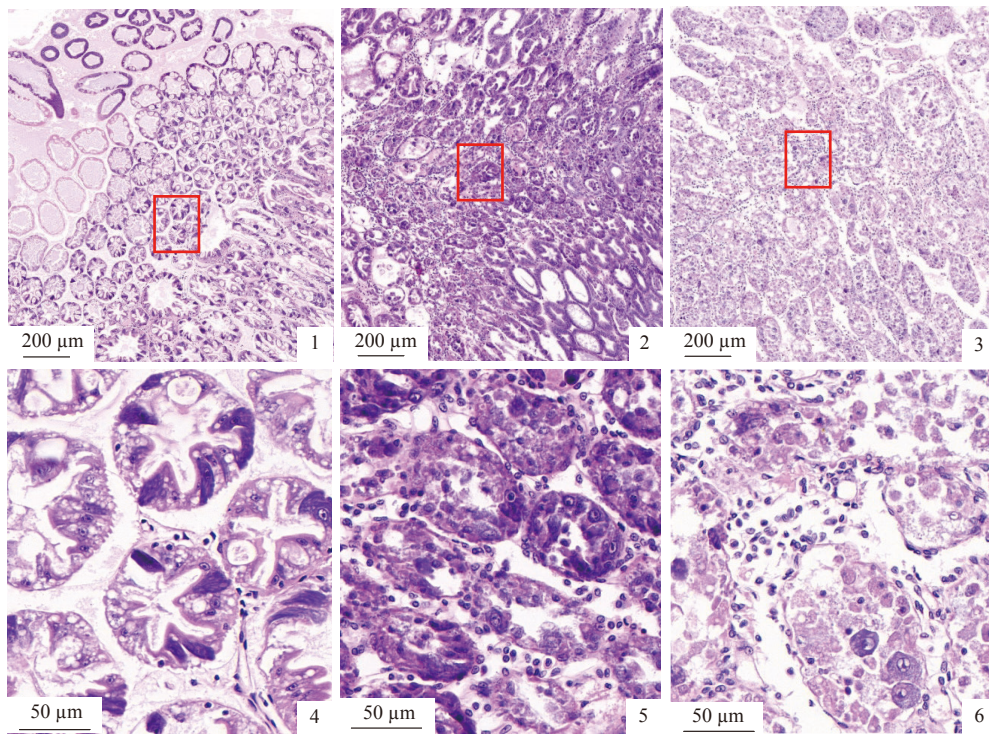
经 *Vp*_{AHPND} 浸浴感染的免疫组和对照组发病

对虾, 肝胰腺颜色变浅、萎缩、糜烂, 空肠空胃。组织病理观察显示, 与健康对虾结构饱满的肝胰腺组织 (图版-1, 4) 相比, 免疫组濒死对虾肝胰腺小管上皮细胞脱落, 部分肝胰腺小管上皮层变薄, 细胞核肿胀 (图版-2, 5); 对照组濒死对虾肝胰腺病变程度更为严重, 组织结构松散, 呈弥漫性坏死, 仅残留部分组织碎片 (图版-3, 6), 呈现典型 AHPND 病理特征。感染组濒死对虾中致病菌毒力基因 *pirA_{vp}* 的 qPCR 检测结果呈强阳性, 证明浸浴感染实验中死亡的对虾均由 AHPND 导致。

3 讨论

3.1 *Vp*_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾生长和存活的影响

特异性卵黄抗体不仅可以为动物机体提供被动免疫保护, 而且具有提高动物生长性能的效果, 还会对动物肠道形态和肠道微生物区系产生积极的影响^[28-29]。张文飞等^[30]报道在饲料中添加抗大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 多价卵黄抗体能显著改善断奶仔猪生长性能, 提高平均日增重, 增强仔猪



图版 凡纳滨对虾肝胰腺组织病理观察

1、4. 健康对虾; 2、5. 免疫组濒死对虾; 3、6. 对照组濒死对虾; 4-6 分别是 1-3 红框区域的放大

Plate The histopathological observation of *L. vannamei* hepatopancreas

1, 4. healthy shrimp; 2, 5. moribund shrimp from IgY agent groups; 3, 6. moribund shrimp from control group; 4-6 are the magnification of the red box area of 1-3, respectively

免疫力。巨晓军等^[31]报道了添加卵黄抗体可以促进雏鸡生长,增强机体抵抗力,进而加快生长速度,提高畜禽日增重。在水产方面,李英英等^[32]在鳗鲡 (*Anguilla* sp.) 饲料中添加 0.3% 的功能性卵黄粉,可增强鳗鲡抗嗜水气单胞菌侵染的能力,并提高其生长性能。本研究将 Vp_{AHPND} 卵黄抗体制剂添加到饲料中投喂养殖阶段的凡纳滨对虾,结果发现,与未投喂卵黄抗体的对照组相比,投喂卵黄抗体的免疫组对虾其存活率有一定程度的提高,对虾平均生长速率和特定生长速率均略有降低。但统计分析显示,上述差异均不显著。因此,卵黄抗体对不同养殖阶段、养殖密度、养殖时长的凡纳滨对虾是否也具有促生长作用还需要进一步研究。

3.2 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾肝胰腺免疫酶活性的影响

凡纳滨对虾没有特异性免疫,其主要依靠细胞和体液免疫反应来抵御病原体。其中体液免疫主要由 PO 激活系统及免疫相关蛋白,如 SOD、LZM、凝集素和抗菌肽等组成^[33-34]。活化的 PO 催化酚类逐步氧化为醌类,从而使病毒等病原体失活,PO 活性与对虾抗病性呈正相关。SOD 是对虾体内的一种主要抗氧化酶,可以清除体内包裹或吞噬病原体后产生的过量活性氧,防止组织损伤,是衡量凡纳滨对虾免疫调节活性的生物标志物^[35]。有研究表明,抗副溶血性弧菌外膜蛋白的卵黄抗体可以提高对虾肌肉组织的 SOD 活性^[36]。LZM 是一种可以水解细菌细胞壁成分的酶,是一种重要的体液免疫因子,其主要功能是依次切断细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的 β -(1,4)-糖苷键,破坏细胞壁,导致细菌裂解^[37]。研究发现,在饲料中添加白斑综合征病毒卵黄抗体,可提高凡纳滨对虾血清中 PO、SOD、LZM 活性,增强对虾抗白斑综合征病毒 (WSSV) 的能力^[27]。

本研究结果显示,0.2% 免疫组对虾肝胰腺的 PO、SOD、LZM 活性均显著高于对照组,表明投喂的 Vp_{AHPND} 卵黄抗体有效激活了凡纳滨对虾的抗氧化防御系统,增强了机体吞噬和清除病原体、分解细菌细胞壁的能力; Vp_{AHPND} 浸泡感染实验结果显示,0.2% 免疫组对虾的存活率显著高于对照组。0.5% 免疫组对虾肝胰腺的 PO、SOD 活性与对照组相比均无显著性差异,仅 LZM 活性显著高于对照组;在 Vp_{AHPND} 浸泡感染实验中,

0.5% 免疫组对虾的存活率虽然也高于对照组,但差异不显著。上述结果表明,凡纳滨对虾肝胰腺 PO、SOD、LZM 活性与对虾抗 Vp_{AHPND} 感染能力密切相关; Vp_{AHPND} 卵黄抗体通过提升凡纳滨对虾的 PO、SOD、LZM 活性,增强了对虾抵抗 Vp_{AHPND} 感染的能力,有效地提高了免疫对虾的存活率。这可能是卵黄抗体重要的抗病机制之一。

ACP 是吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞吞噬和包裹过程中,吞噬溶酶体随着 ACP 的释放起到杀菌作用。AKP 作为溶酶体酶的重要组成部分,在无脊椎动物的免疫反应中发挥作用。本研究结果显示,投喂 Vp_{AHPND} 卵黄抗体 14 d 后,免疫组对虾肝胰腺的 ACP 和 AKP 活性与对照组相比均无显著性差异,表明这 2 种酶可能与特异性卵黄抗体的抗菌作用机制关系不大。

3.3 Vp_{AHPND} 卵黄抗体对凡纳滨对虾肝胰腺免疫基因表达水平的影响

抗菌肽是一种原始的具有防御功能的生物分子,具有广谱的抗菌活性,能够杀死或中和细菌、真菌、寄生虫和病毒^[38]。本研究结果显示,0.2% 免疫组对虾肝胰腺抗菌肽基因的表达水平显著高于对照组,表明免疫对虾的抗菌肽基因可被卵黄抗体激活。这可能是卵黄抗体增强对虾抵抗 Vp_{AHPND} 感染的能力、提高免疫对虾存活率的另一个重要途径。 β -GBP-HDL 是甲壳动物对抗副溶血性弧菌感染的一个重要免疫因子,同时也在激活酚氧化酶原系统、凝结过程等方面起着重要作用。杨运楷等^[39]发现, β -GBP-HDL 在凡纳滨对虾抵抗副溶血性弧菌侵染的过程中发挥了积极的作用。本研究结果显示,在卵黄抗体免疫期,免疫组 β -GBP-HDL 的相对表达水平比对照组显著下降,其原因和意义还需要进一步研究。

Hsp70 是一种分子伴侣和环境应激蛋白,可以与病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 结合,对刺激天然免疫和消除病原体至关重要^[40-41]。凝集素是一种重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs),可以使甲壳动物体内异物颗粒聚集或凝集,帮助机体清除异源物质,在抵抗病原体方面起着至关重要的作用^[42]。本研究结果显示,投喂 Vp_{AHPND} 卵黄抗体 14 d 后,免疫组对虾肝胰腺的 Hsp70 和凝集素基因的相对表达水平与对照组相比均无显著性差异,这可能与免疫期对虾未受到病原菌刺

迫有关, 也可能意味着 *Hsp70* 和凝集素基因与特异性卵黄抗体的抗菌作用机制关系不大。

3.4 *Vp_{AHPND}* 卵黄抗体对凡纳滨对虾抗 AHPND 的效果

浸浴感染实验结果显示, 添加 0.2% *Vp_{AHPND}* 卵黄抗体制剂对凡纳滨对虾的相对免疫保护率为 63.77%, 适量添加卵黄抗体可显著提高凡纳滨对虾抗 *Vp_{AHPND}* 感染的能力, 有效防控 AHPND。另一方面, 与 0.5% 免疫组相比, 0.2% 免疫组在免疫期具有更高的对虾存活率、更高的肝胰腺 SOD 活性和抗菌肽基因表达水平, 在 *Vp_{AHPND}* 感染期具有更高的相对免疫保护率。韦蒿等^[27] 在使用卵黄抗体抗凡纳滨对虾 WSSV 感染的实验中, 也发现投喂低浓度卵黄抗体的实验组比高浓度组的免疫酶活性高、累积死亡率低, 与本研究结果一致。因此, 卵黄抗体的添加剂量与其抗病效果关系密切, 添加量并非越多越好。这一现象可能与卵黄抗体的作用机制有关, 值得更加深入、细致地研究。

综上所述, 本研究证实在饲料中添加 0.2% 和 0.5% 的 *Vp_{AHPND}* 卵黄抗体制剂, 在免疫阶段对本实验阶段的凡纳滨对虾的生长和存活率均无显著性影响; 添加 0.2% *Vp_{AHPND}* 卵黄抗体制剂可显著提高凡纳滨对虾肝胰腺 PO、SOD、LZM 活性和抗菌肽基因的相对表达水平, 增强对虾免疫机能和抗 *Vp_{AHPND}* 感染的能力, 显著提高患病对虾的存活率。特异性卵黄抗体作为一种有效的绿色生物制剂, 可以为防控对虾疫病提供一种新的途径, 具有很强的应用潜力。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome: FAO, 2020, 30. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- [2] Crab R, Defoirdt T, Bossier P, et al. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges[J]. *Aquaculture*, 2012, 356: 351-356.
- [3] Lafferty K D, Harvell C D, Conrad J M, et al. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics[J]. *Annual Review of Marine Science*, 2015, 7(1): 471-496.
- [4] OIE. Aquatic animal health code, 21st Edition. Paris: OIE, 2018: 161-165.
- [5] Tran L, Nunan L, Redman R, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55.
- [6] Lee C T, Chen I T, Yang Y T, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): 10798-10803.
- [7] Wang H, Wang C, Tang Y, et al. *Pseudoalteromonas* probiotics as potential biocontrol agents improve the survival of *Penaeus vannamei* challenged with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture*, 2018, 494: 30-36.
- [8] Burrige L, Weis J S, Cabello F, et al. Chemical use in salmon aquaculture: a review of current practices and possible environmental effects[J]. *Aquaculture*, 2010, 306(1-4): 7-23.
- [9] Han J E, Mohny L L, Tang K F J, et al. Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps[J]. *Aquaculture Reports*, 2015, 2: 17-21.
- [10] Neela F A, Nonaka L, Suzuki S. The diversity of multi-drug resistance profiles in tetracycline-resistant *Vibrio* species isolated from coastal sediments and seawater[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(1): 64-68.
- [11] Squadrone S. Water environments: metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2020, 192(4): 238.
- [12] Félix D M, Elías J A L, Córdova Á I C, et al. Survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp fed on diets supplemented with *Dunaliella* sp. is improved after challenges by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2017, 148: 118-123.
- [13] Junprunga W, Supungulb P, Tassanakajon A. *Litopenaeus vannamei* heat shock protein 70 (*LvHSP70*) enhances resistance to a strain of *Vibrio parahaemolyticus*, which can cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), by activating shrimp immunity[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2019(90): 138-146.

- [14] Zhai Q Q, Li J. Effectiveness of traditional Chinese herbal medicine, San-Huang-San, in combination with enrofloxacin to treat AHPND-causing strain of *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 87: 360-370.
- [15] Jun J W, Han J E, Giri S S, *et al.* Phage application for the protection from acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei*[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2018, 58(1): 114-117.
- [16] Chang Y H, Kuo W C, Wang H C, *et al.* Biocontrol of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp using a microalgal-bacterial consortium[J]. *Aquaculture*, 2020, 512: 734990.
- [17] 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.
- [18] Warr G W, Magor K E, Higgins D A. IgY: clues to the origins of modern antibodies[J]. *Immunol Today*, 1995, 16(8): 392-398.
- [19] Pereira E P V, Tilburg M F, Guedes M I F, *et al.* Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 73: 293-303.
- [20] Qin Z D, Sarath B V, Li N Q, *et al.* Protective effects of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY) against experimental *Aeromonas hydrophila* infection in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 78: 26-34.
- [21] Yi L Z, Qin Z D, Lin H Z, *et al.* Features of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against the infection of red-spotted grouper nervous necrosis virus[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 534-539.
- [22] Kumaran T, Thirumalaikumar E, Lelin C, *et al.* Physico-chemical properties of anti *Vibrio harveyi* egg yolk antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 74: 349-362.
- [23] Nakamura R, Pedrosa-Gerasmio I, Alenton R R, *et al.* Anti-PirA-like toxin immunoglobulin (IgY) in feeds passively immunizes shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(8): 1125-1132.
- [24] 闫茂仓, 王瑶华, 胡利华, 等. 副溶血弧菌特异性卵黄抗体(AHPND-VpIgY)对凡纳滨对虾幼体被动免疫和育苗成活率的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 443-448.
- Yan M C, Wang Y H, Hu L H, *et al.* Effect of specific anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY on passive immunology and survival rate of *Litopenaeus vannamei* larval[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(2): 443-448 (in Chinese).
- [25] Han J E, Tang K F J, Pantoja C R, *et al.* qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 442: 12-15.
- [26] 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[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(4): 46-51.
- Lei Z W, Huang J, Yang B, *et al.* Immune factors in haemolymph supernatant of *Penaeus chinensis* infected by WSSV[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(4): 46-51 (in Chinese).
- [27] 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[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 112-118.
- 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*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 112-118 (in Chinese).
- [28] Lakeh A A B, Farahm H, Mirvaghefi A. GH and IGF-I induction by passive immunisation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using a somatostatin-14 antibody[J]. *Aquaculture*, 2011, 316(1-4): 99-103.
- [29] Bazyar Lakeh A A, Farahmand H, Kloas W, *et al.* Growth enhancement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by passive immunization against somatostatin-14[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(1): 11-21.
- [30] 张文飞, 刘莘莘, 管武太, 等. 饲料中添加卵黄抗体对断奶仔猪生长性能、血清生化指标、肠道形态及肠道微生物菌群的影响[J]. *动物营养学报*, 2017, 29(1): 271-279.
- Zhang W F, Liu P P, Guan T W, *et al.* Effects of dietary supplementation of Immunoglobulin of yolk on growth performance, serum biochemical parameters, intestinal morphology and microbial flora of weaned piglets[J]. *中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries*

- Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2017, 29(1): 271-279 (in Chinese).
- [31] 巨晓军, 马尹鹏, 杨海明, 等. 非特异性卵黄抗体对雏鸡生长性能、免疫机能及微生物数量的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 45(10): 2916-2922.
Ju X J, Ma Y P, Yang H M, *et al.* Effects of nonspecific IgY on growth performance, immune function and microbiota number of chicks[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 45(10): 2916-2922 (in Chinese).
- [32] 李英英, 宋铁英, 江兴龙, 等. 鱼用功能性卵黄粉对鳗鲡的免疫保护和生长性能的影响[J]. *饲料工业*, 2018, 39(16): 19-23.
Li Y Y, Song T Y, Jiang X L, *et al.* Effects of the aquatic functional yolk powder on immune protection and growth performance of the eels[J]. *Siliao Gongye*, 2018, 39(16): 19-23 (in Chinese).
- [33] Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, *et al.* Review: immunity mechanisms in crustaceans[J]. *Innate Immunity*, 2009, 15(3): 179-188.
- [34] 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*[J]. *Immunological Reviews*, 2004, 198(1): 149-168.
- [35] Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2002, 133(4): 557-565.
- [36] Hu B, Yang X, Guo E, *et al.* The preparation and antibacterial effect of egg yolk immunoglobulin (IgY) against the outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 2019, 99(5): 2565-2571.
- [37] Wang T, Xu Y, Liu W, *et al.* Expression of *Apostichopus japonicus* lysozyme in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 77(1): 20-25.
- [38] Hancock R E, Scott M G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(16): 8856-8861.
- [39] 杨运楷, 宋晓玲, 王海亮, 等. 一种复合益生菌对凡纳滨对虾抗副溶血弧菌感染能力的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(3): 133-141.
Yang Y K, Song X L, Wang H L, *et al.* Effect of a compound probiotics on the ability of *Litopenaeus vannamei* to resist *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(3): 133-141(in Chinese).
- [40] Pockley A G, Muthana M, Calderwood S K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2008, 33(1): 71-79.
- [41] Yang C, Zhang J, Li F, *et al.* A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 564-574.
- [42] Marques M R, Barracco M A. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1-3): 23-44.

Effect of IgY on the growth, immunity and resistance to Vp_{AHPND} infection of *Litopenaeus vannamei*

WANG Renbao^{1,2}, SHI Chengyin^{2*}, SONG Xiaoling², WANG Yiting^{2,3}, ZHANG Huifen^{2,3},
REN Ningxin^{1,2}, XIE Guosi², ZHANG Qingli²

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. 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, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

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

Abstract: Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is the major bacterial disease of cultured shrimps, mainly caused by *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (Vp_{AHPND}). The aim of this study was to explore the anti-AHPND effect and its mechanism of immunoglobulin of yolk (IgY). Different doses of Vp_{AHPND} IgY agent (0, 0.2% and 0.5%) were added to shrimp feeds and immunized the juvenile *L. vannamei* for 28 d. The growth rate and survival rate of the juveniles, the activity of immune enzymes and the relative expression level of immune genes in shrimp hepatopancreas were measured. The resistance to Vp_{AHPND} infection of immunized juveniles was determined by the immersion infection. The growth experiment results showed that after 28 d of immunization, there was no significant difference in the average growth rate, specific growth rate and survival rate of the juveniles between the immunized group and the control group. The immune function test results showed that after 14 d of immunization, compared with the control group, the 0.2% immunized group (0.2% IgY agent) generated significantly higher enzyme activities for phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme in the hepatopancreas. The relative expression level of antibacterial peptide (Crustin) gene was also significantly increased, while the relative expression level of β -1,3-glucan binding protein-lipoprotein (β -GBP-HDL) gene was significantly reduced in the 0.2% IgY agent group. The results of the immersion infection showed that the survival rate of the juveniles in the 0.2% IgY agent group was significantly higher than that of the control group, and the relative percentage of survival (RPS) of 0.2% IgY agent was 63.77%. In conclusion, oral administration of Vp_{AHPND} IgY agent will not adversely affect the growth and survival of *L. vannamei*. The 0.2% IgY agent can significantly enhance the immune function of *L. vannamei* by increasing the enzyme activities of PO, SOD, LZM and the expression level of Crustin gene, thereby improving the ability of shrimps to resist Vp_{AHPND} infection. This study implied that Vp_{AHPND} IgY agent has a strong application potential for the prevention of AHPND.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; immunoglobulin of yolk (IgY); growth performance; acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND); immune response; gene expression

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

Funding projects: Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China; National Natural Science Foundation of China (31802342); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD39)