



抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌三联卵黄抗体的制备及体外作用效果评估

张林鹏, 杨诗燧, 白艳韩, 刘沥涵, 陶俊杰,
林 鑫*, 秦真东*

(仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225)

摘要: 为研究三联特异性卵黄抗体对哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌的体外抑菌效果, 通过制备哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌三联灭活疫苗, 免疫蛋鸡。收集鸡蛋制备卵黄抗体并检测其效价、纯度和特异性。通过免疫荧光、扫描电镜和体外抑菌实验初步探究其制备的三联特异性卵黄抗体对3种弧菌的体外抑菌效果。结果显示, ELISA检测特异性卵黄抗体效价高达1:51200, 并维持5周; SDS-PAGE对分离纯化的卵黄抗体分析显示, 随着纯化步骤的进行, 卵黄抗体中的蛋白杂带逐渐减少, 纯度变高。免疫荧光和免疫印迹实验表明, 特异性卵黄抗体与抗原的结合具有较高的特异性。扫描电镜进一步观察发现, 相比非特异性卵黄抗体, 特异性卵黄抗体处理过的弧菌, 菌体互相黏附在一起, 菌体细胞表面粗糙, 细胞壁破损。在体外抑菌实验中, 特异性卵黄抗体对弧菌具有明显的抑制效果, 且抑制作用呈现剂量依赖性。研究表明, 三联特异性卵黄抗体能够与哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌发生特异性结合, 通过体外实验发现, 卵黄抗体通过凝集和黏附, 破坏菌体细胞的完整性, 从而发挥抑菌作用。实验结果为研发绿色、安全、高效的抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌三联特异性卵黄抗体提供理论和实验基础。

关键词: 水产养殖; 哈维氏弧菌; 溶藻弧菌; 副溶血性弧菌; 卵黄抗体; 抑菌

中图分类号: S 941

文献标志码: A

哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 和副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 引起的弧菌病, 可导致鱼类、甲壳类和双壳类动物的高死亡率, 给全球范围内的水产养殖业带来严重的经济损失^[1-2]。哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌是一类广泛分布于河口、海域及多种海洋动物体内的革兰氏阴性杆菌^[3-5]。哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌可感染多种水生

动物, 如凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、金头鲷 (*Sparus aurata*)、三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*)、紫扇贝 (*Argopecten purpuratus*) 和等^[6-11]。近年来, 随着水产养殖业的迅速发展和养殖密度的不断增加, 水环境持续恶化, 为弧菌的传播创造了更为适宜的条件, 同时也对水生动物的健康

收稿日期: 2024-02-28 修回日期: 2024-04-07

资助项目: 广东省普通高校重点项目(乡村振兴)(2020ZDZX1026); 揭阳市(市级)引进创新创业团队和领军人才项目(src003)

第一作者: 张林鹏(照片), 从事水产病害研究, E-mail: zhang1130295013@163.com

通信作者: 林鑫, 从事水产动物免疫学研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn;

秦真东, 从事水产动物基础免疫研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com



构成了严重的威胁, 已成为制约水产养殖业持续健康发展的重大障碍。

长期以来, 水产病害的防治主要依赖于抗生素和化学药物的使用, 然而, 长期使用化学药物不仅会造成水环境污染, 使得水生动物和水产品中出现抗生素残留, 而且还催生了耐药菌和耐药基因, 严重影响了水产品的质量和安全, 阻碍了水产养殖业的良性发展^[12-14]。自 2006 年 1 月起, 欧盟全面禁止使用抗生素作为动物促生长剂, 美国食品药品监督管理局自 2013 年 12 月起逐步淘汰家畜中使用非医疗目的的抗生素, 我国农业农村部宣布自 2020 年 1 月起, 饲料中全面禁止添加抗生素, 旨在减少滥用抗生素造成的危害, 维护动物源食品安全和公共卫生安全^[15-16]。在抗生素选择日益受限的背景条件下, 寻找一种替代策略以对抗生素耐药性显得尤为关键, 研究表明, 卵黄抗体的被动免疫是一种非常有前景的替代策略, 具有治疗动物和人类感染的潜力^[17]。

免疫球蛋白 Y (immunoglobulin Y, IgY) 又称卵黄抗体, 主要存在于鸡和其他鸟类、爬行类和两栖类动物的血清中, 当母鸡受到外来物质刺激时, 法氏囊中成熟的 B 细胞会分化成浆细胞, 这些浆细胞产生的抗体通过血液循环沉淀在卵黄中, 随后形成卵黄抗体^[16]。与哺乳动物 IgG 相比, 卵黄抗体具备制备简单、价格低廉、产量高、不污染环境、无耐药性、非侵入性、免疫应答性强和特异性强等优点^[16, 18]。卵黄抗体已广泛用于细菌、病毒及寄生虫感染的防治, 其作用机制主要通过以下 4 种途径实现: ① 破坏菌体表面结构, 改变病原菌细胞的完整性, 抑制其生长; ② 黏附细菌的菌毛或病毒的衣壳蛋白, 阻断其对细胞或组织的侵袭; ③ 改变致病菌、病毒表面结构和电场, 促进和加强吞噬细胞对细菌、病毒的吞噬和清除能力; ④ 阻断毒素与细胞表面受体结合, 对细胞起到保护作用^[16, 19-20]。在体外抑菌实验中, 卵黄抗体能够抑制大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、副溶血性弧菌、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 的生长, 且呈现剂量依赖性^[21-25]。

本实验通过制备哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌三联灭活疫苗, 免疫健康蛋鸡, 获得三联特异性卵黄抗体。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、蛋白质免疫印迹实验 (West-

ern blot) 和酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测抗体纯度、特异性和效价。在体外实验中, 利用免疫荧光和扫描电镜观察三联特异性卵黄抗体与菌体的结合情况, 以及菌体表面结构的变化; 通过抑菌实验, 考察三联特异性卵黄抗体对哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌的体外生长抑制作用, 进一步探究其抑菌效果, 为研发绿色、安全、高效的抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌三联特异性卵黄抗体提供理论和实验基础。这种方法有望成为水产养殖业中替代抗生素的有效手段, 为水生动物提供被动免疫保护, 从而降低疾病的发生率。同时减少对抗生素的依赖, 提高水产品的质量, 改善水环境污染问题, 促进水产养殖业的健康可持续发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株与实验动物 哈维氏弧菌 (GDMCC NO. 1.781)、溶藻弧菌 (GDMCC NO. 1.451) 购自广东省微生物菌种保藏中心, 副溶血性弧菌来自本实验室; 健康的海兰褐壳蛋鸡购自广州市养殖场, 平均日龄 147 d, 隔离饲养 2 周后, 根据后续实验分组进行处理。本研究获得了仲恺农业工程学院实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守仲恺农业工程学院动物保护和伦理委员会伦理规范。

主要试剂 弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂、脱脂奶粉购自 BioFroxx 公司; 硫酸铵购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 氯化钠购自广州化学试剂厂; TMB 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司; ELISA 包被液、NC 膜、考马斯亮蓝 R-250、Tween-20 购自北京索莱宝科技有限公司; 兔抗鸡 IgY-HRP 购自 Abcam 公司; 蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉购自 Oxoid 公司; 2216E 液体培养基购自青岛海博生物技术有限公司; ECL 化学发光超敏显色试剂盒购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 蛋白分子量标准、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 抗原的制备

复苏的哈维氏弧菌、溶藻弧菌、副溶血性弧

菌分别按照 1 : 100 比例 (体积比) 分别接种于 2216E 和 LB 液体培养基中, 分别于 30 °C 和 37 °C, 160 r/min 振荡培养 12 h。4 °C, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 菌体用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4) 洗涤 3 次后, 得到菌悬液。菌悬液中加入终浓度为 0.4% 的甲醛, 室温振荡培养 24 h 灭活菌体, 取 100 μ L 灭活的菌悬液涂布固体培养基, 检测细菌的灭活效果。菌体用 PBS 洗涤 4 次, 离心后的 3 种菌体分别用等量 PBS 重悬后, 按照体积比 1 : 1 : 1 的比例混匀, 调整混合的菌悬液终浓度为 3×10^8 CFU/mL。将灭活的维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌抗原, 置于 4 °C 冰箱备用。

1.3 免疫蛋鸡

将 50 只健康海兰褐壳蛋鸡 (Hy-Line Brown laying hens) 随机分为实验组和对照组, 每组 25 只。蛋鸡进行 1 次基础免疫和 3 次加强免疫, 初次免疫和加强免疫时, 用灭活的 3 种弧菌抗原分别与等量的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂充分乳化。首次免疫时, 对蛋鸡胸肌进行分区注射, 免疫剂量为 1 mL/只, 加强免疫时, 免疫剂量为 1.5 mL/只, 每次免疫间隔 10 d。对照组用 PBS 与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂充分乳化, 免疫程序和免疫时间同实验组。首次免疫后的每周日开始收集鸡蛋, 4 °C 冰箱保存备用。

1.4 分离纯化卵黄抗体

高免鸡蛋先用水冲洗干净后, 再用 75% 乙醇擦拭蛋壳, 通过卵黄分离器分离卵黄, 然后在卵黄中加入 7 倍体积的预冷无菌蒸馏水, 用 0.1 mol/L HCl 调整 pH 浓度为 5.0, 混匀后于 4 °C 冰箱中静置 12 h。4 °C, 12 000 r/min, 离心 25 min, 弃沉淀, 上清液依次用 0.45 和 0.22 μ m 针头过滤器过滤杂质除菌, 滤液即为卵黄抗体的水溶性组分 (water-soluble fraction, WSF), 用于后续特异性卵黄抗体效价的测定。

向 WSF 中缓慢加入硫酸铵溶液至终浓度为 55%, 充分搅拌均匀后 4 °C 静置 12 h。4 °C, 12 000 r/min, 离心 20 min, 沉淀用 PBS 稀释至原体积, 再加入硫酸铵溶液至终浓度为 33%, 充分搅拌均匀后 4 °C 静置 2 h。4 °C, 12 000 r/min, 离心 20 min, 沉淀用 PBS 重悬, 得到特异性卵黄抗体, -20 °C 保存。

1.5 卵黄抗体效价的测定

参照已有文献^[26], 以哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌为抗原, 分别用 ELISA 包被液调整终浓度为 1×10^8 CFU/mL, 特异性卵黄抗体作为一抗, 粗提的特异性卵黄抗体的 WSF 分别按 1 : 100、1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1 600、1 : 3 200、1 : 6 400、1 : 12 800、1 : 25 600 和 1 : 51 200 梯度稀释 (体积比), 以相应稀释倍数的非特异性卵黄抗体的 WSF 做阴性对照, 空白组不添加 WSF。以 HRP 标记的兔抗鸡 IgY 作为二抗, 采用间接 ELISA 法测定特异性卵黄抗体中抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌的抗体效价。 $P/N = (\text{待测样品} - \text{空白对照}) / (\text{阴性对照} - \text{空白对照}) \geq 2.1$ 时, 即为卵黄抗体的效价值, 对应样品的最大稀释倍数为特异性卵黄抗体的效价。

1.6 SDS-PAGE 检测卵黄抗体纯度

将水稀释-盐析法制备的特异性卵黄抗体与 $5 \times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液按照体积比 4 : 1 的比例混匀, 煮沸 10 min 使蛋白变性。按照 12% SDS-PAGE 凝胶试剂说明书配制上层胶和下层胶, 随后进行 SDS-PAGE, 电泳结束后分离凝胶^[27]。用考马斯亮蓝 R-250 染色液室温染色 2 h, 凝胶置于水中煮沸脱色, 凝胶成像系统拍照。

1.7 Western blot 验证卵黄抗体的特异性

分别把哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌与特异性卵黄抗体和非特异性卵黄抗体室温孵育 2 h, 样品煮沸后离心, 通过 10% 还原型 SDS-PAGE 电泳, 电泳步骤同“SDS-PAGE 检测卵黄抗体纯度”。凝胶上蛋白质转移到 NC 膜上, 封闭液室温封闭 2 h。洗涤 5 次后与 HRP 标记的兔抗鸡 IgY (1 : 5 000 稀释) 室温孵育 1 h。洗涤 5 次, 使用 ECL 化学发光超敏显色试剂避光显色, 凝胶成像系统拍照。

1.8 扫描电镜

将含有特异性卵黄抗体或非特异性卵黄抗体的 WSF 组分用超滤浓缩管, 超滤浓缩至蛋白质浓度为 16 mg/mL, 浓缩液用 0.45 μ m 针式过滤器过滤, 滤液分别与 2216E 和 LB 液体培养基等比混匀。将混匀后的液体用 0.22 μ m 针式过滤器过滤除菌。分别将对数生长期的哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌终浓度调整为 1×10^6 CFU/mL,

37 °C 孵育 2 h。4 000 r/min 离心 10 min, 菌体用 PBS 洗涤 3 次, 离心收集沉淀。菌体沉淀依次用 2.5% 戊二醛固定液室温固定 2 h、乙醇脱水、干燥、喷金, 随后通过扫描电子显微镜观察。

1.9 免疫荧光

将灭活的哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌分别用 PBS 调整菌悬液终浓度为 1×10^6 CFU/mL, 各取 750 μ L 的菌悬液, 分别加入等体积的含有特异性卵黄抗体或非特异性卵黄抗体 (16 mg/mL) 的 WSF 组分, 同时设置不含卵黄抗体的 PBS 为空白对照, 37 °C 孵育 2 h。5 000 r/min, 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入 Fitc 标记的兔抗鸡 IgG (1 : 200 稀释) 400 μ L, 37 °C 避光孵育 2 h。PBS 洗涤 4 次后, 重悬沉淀, 吸取 10 μ L 重悬液滴于载玻片, 盖玻片固定, 使用荧光显微镜检测特异性卵黄抗体与抗原的结合情况。

1.10 体外抑菌实验

将含有特异性卵黄抗体或非特异性卵黄抗体的 WSF 组分, 分别用超滤浓缩管超滤浓缩, 用微量分光光度计调整卵黄抗体的蛋白浓度, 分别为 2、4、8 和 16 mg/mL, 以不含卵黄抗体的 2216E 和 LB 液体培养基为空白对照。所有溶液均依次通过 0.45 和 0.22 μ m 针式过滤器过滤除菌。分别取对数生长期的哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌, 用 PBS 重悬至终浓度为 1×10^7 CFU/mL, 将菌液与不同浓度的特异性卵黄抗体、非特异性卵黄抗体和 PBS 按照体积比 1 : 1 充分混匀。将哈维氏弧菌、溶藻弧菌和卵黄抗体的混合液, 副溶血性弧菌与卵黄抗体的混合液, 分别置于 30 °C 和 37 °C 摇床中振荡培养, 每隔 2 小时取 150 μ L 测定 OD_{620 nm} 吸光度, 并绘制抑菌曲线。

1.11 数据分析

数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 每个数据重复 3 次, 使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 ELISA 检测特异性卵黄抗体效价变化趋势

通过 ELISA 检测免疫后每周卵黄中的特异性卵黄抗体效价变化趋势, 结果显示, 初次免疫后

抗体效价出现缓慢上升, 随着加强免疫的进行, 第 2 次加强免疫后抗体效价开始明显升高。哈维氏弧菌 (图 1-a)、溶藻弧菌 (图 1-b) 和副溶血性弧菌 (图 1-c) 作为抗原时, 三联特异性卵黄抗体效价分别在初次免疫后的第 6 周和第 7 周达到峰值 (1 :

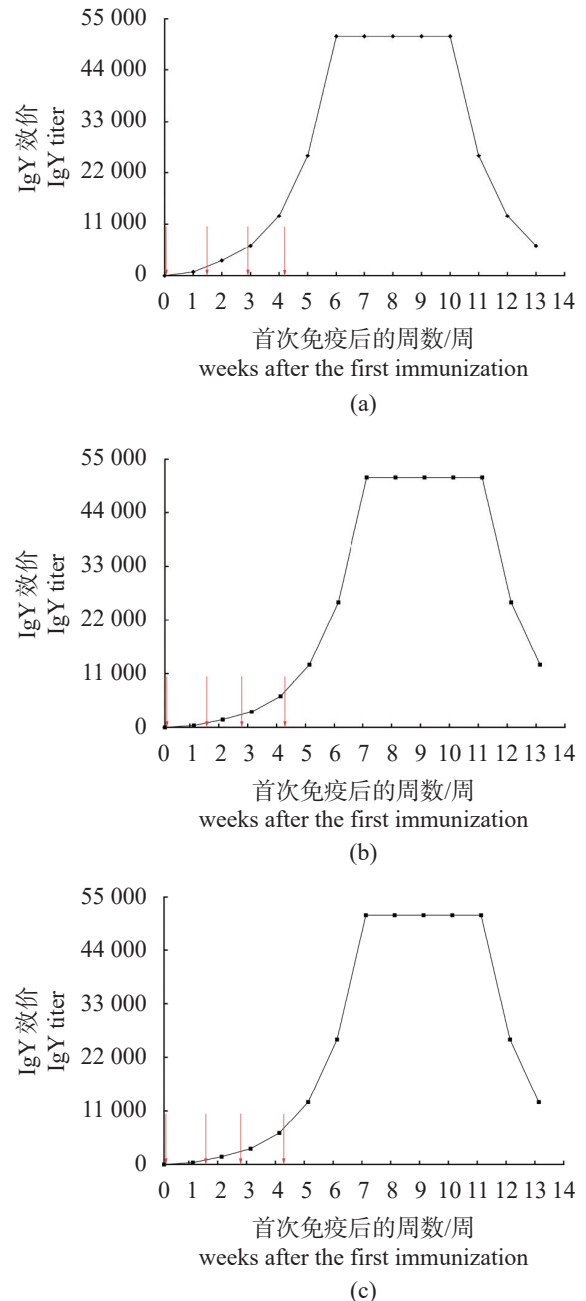


图 1 特异性卵黄抗体效价变化趋势图

4 个红色箭头分别表示初次免疫和 3 次加强免疫, 每次间隔 10 d。(a) 哈维氏弧菌; (b) 溶藻弧菌; (c) 副溶血性弧菌; 下同。

Fig. 1 Trend chart of specific IgY titer change

The four red arrows indicate the initial immunization and three booster immunizations, each separated by 10 d. (a) *V. harveyi*; (b) *V. alginolyticus*; (c) *V. parahemolyticus*; the same below.

51 200), 持续时间约 5 周, 随后开始迅速下降。根据抗体效价的检测结果, 从高效价鸡蛋 (1 : 51 200) 中分离提取卵黄抗体, 用于后续体外相关的实验。

2.2 SDS-PAGE 检测卵黄抗体纯度

通过不同步骤分离纯化的卵黄抗体还原型 SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果显示, 卵黄抗体具有两条重链 (68 ku) 和两条轻链 (25 ku), 随着分离纯化步骤的进行, 卵黄抗体重链和轻链的蛋白条带逐渐变得清晰, 凝胶上的蛋白杂带 (约 38 ku) 逐渐减轻 (图 2)。

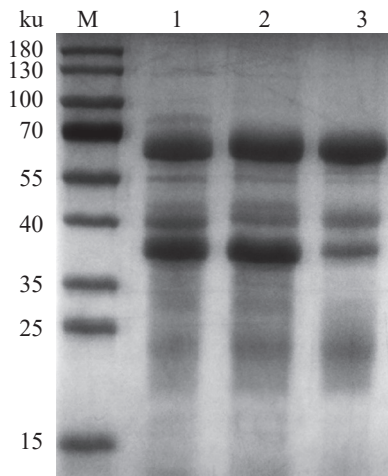


图 2 卵黄抗体不同分离纯化阶段的 SDS-PAGE 图

M. 蛋白分子量标准; 1. 水溶性组分; 2. 第一次盐析; 3. 第二次盐析。

Fig. 2 SDS-PAGE plots of different isolation and purification stages of IgY

M. protein molecular weight standard; 1. water soluble fractions; 2. first salting out; 3. second salting out.

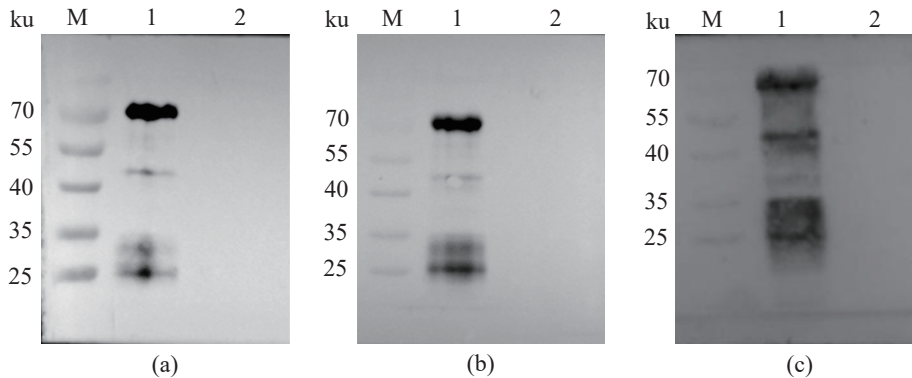


图 3 免疫印迹分析图

M. 蛋白分子量标准; 1. 特异性卵黄抗体; 2. 非特异性卵黄抗体。

Fig. 3 Western blot analysis diagram

M. protein molecular weight standard; 1. specific IgY; 2. non-specific IgY.

2.3 卵黄抗体的特异性

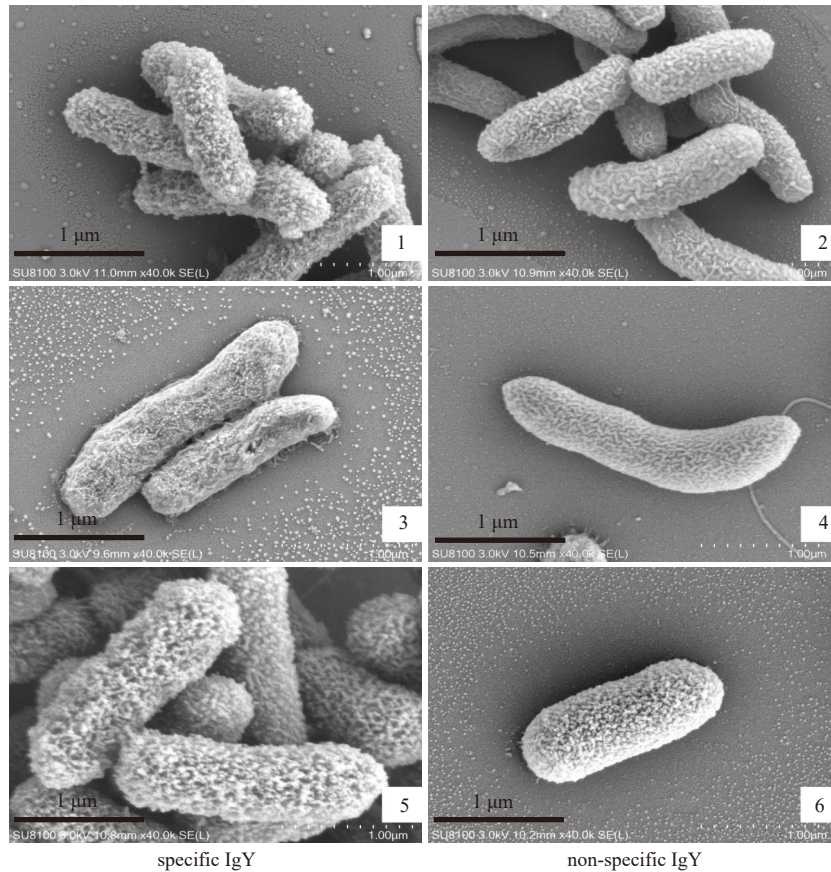
三联特异性卵黄抗体能分别与对应的抗原结合, 使得卵黄抗体重链和轻链被识别而显示出相应的蛋白条带 (图 3), 非抗体成分的杂蛋白条带不能被识别, 表明二抗能与抗原特异性一抗发生特异性结合, 从而识别卵黄抗体的蛋白条带而显色; 非特异性卵黄抗体和抗原不能发生特异性结合, 从而使得蛋白条带不能被识别, 说明非特异性卵黄抗体对抗原不具有特异性。

2.4 特异性卵黄抗体对菌体形态的影响

通过扫描电子显微镜观察三联特异性卵黄抗体对菌体形态的影响, 结果显示, 非特异性卵黄抗体处理的菌体形态饱满, 结构较为完整, 无明显的黏附凝集 (图版 I)。相比之下, 特异性卵黄抗体处理的菌体互相黏附在一起, 菌体表面粗糙, 边缘不光滑, 凹凸不平, 菌体细胞壁破损, 细胞的完整性遭到破坏。结果表明, 特异性卵黄抗体处理后的菌体细胞壁表面结构受到明显的破坏, 细胞的完整性遭到损坏, 进而抑制了病原菌的体外生长繁殖, 这与非特异性卵黄抗体处理组的菌体形成鲜明的对比。

2.5 免疫荧光电镜观察特异性卵黄抗体对致病菌的影响

免疫荧光观察发现, 非特异性卵黄抗体和抗原孵育后, 没有检测到荧光信号, 说明非特异性卵黄抗体和抗原之间缺乏亲和力, 不能有效结合 (图版 II)。在不含卵黄抗体的空白对照组中, 同样观察不到荧光信号, 说明 FITC 标记的兔抗鸡 IgG



图版 I 特异性卵黄抗体对菌体细胞形态结构的影响

1~2. 哈维氏弧菌; 3~4. 溶藻弧菌; 5~6. 副溶血性弧菌。标尺代表 1 μm (放大倍数 40 000 ×)。

Plate I Effect of specific IgY on the morphological structure of bacterial cells

1-2. *V. harveyi*; 3-4. *V. alginolyticus*; 5-6. *V. parahaemolyticus*. Scale represents 1 μm (magnification 40 000×).

与抗原之间没有交叉反应。三联特异性卵黄抗体分别与致病菌一起孵育后, 菌体聚集在一起, 可观察到大量荧光信号, 表明特异性卵黄抗体可以与抗原发生特异性结合, 而 FITC 标记的兔抗 IgG 也可以进一步与卵黄抗体结合, 从而出现绿色荧光。

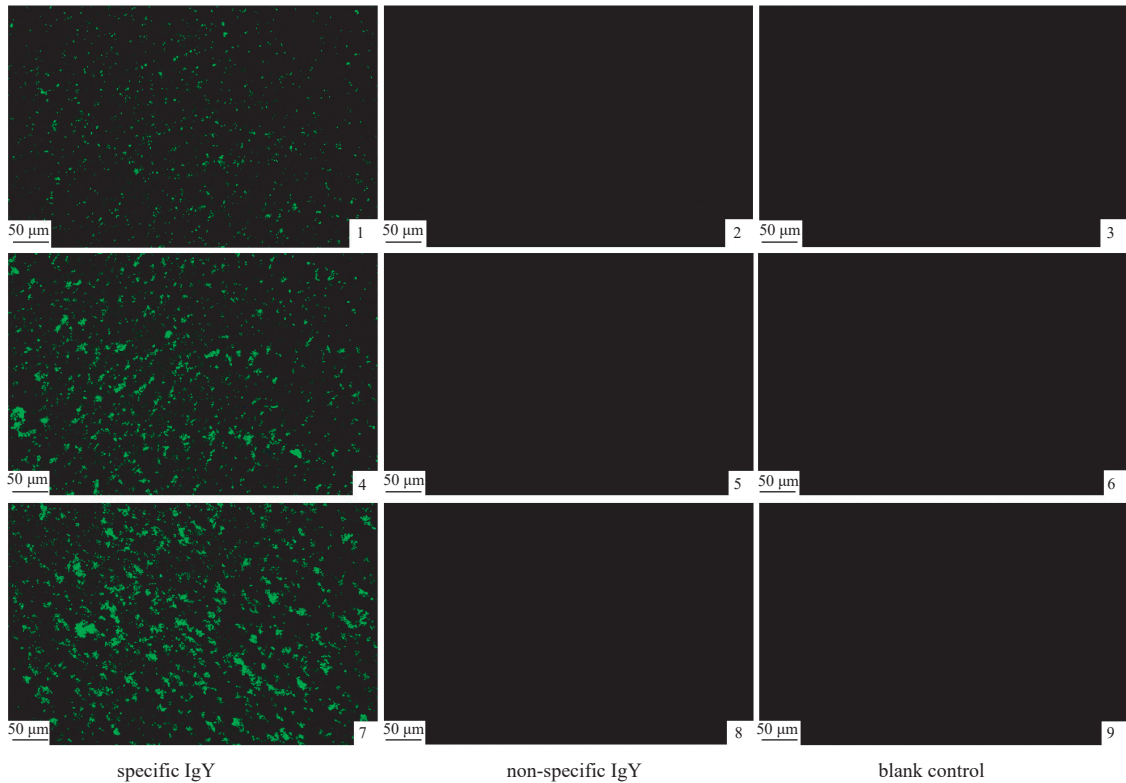
2.6 特异性卵黄抗体对致病菌的体外抑菌效果

在液体培养基条件下, 观察三联特异性卵黄抗体对致病菌的抑菌效果。在培养的前 4 h, 哈维氏弧菌 (图 4-a)、溶藻弧菌 (图 4-b) 与副溶血性弧菌 (图 4-c) 中的特异性卵黄抗体、非特异性卵黄抗体和空白对照组中, 细菌的生长未受到明显的抑制。随着时间的推移, 培养 6 h 后, 特异性卵黄抗体处理的致病菌生长速度开始出现下降。在浓度为 1~8 mg/mL, 随着特异性卵黄抗体浓度的增加, 其抑菌效果逐渐增强, 表明特异性卵黄抗体对致病菌的体外生长具有明显的抑制作用, 且呈现剂量依赖性。非特异性卵黄抗体组中的致病菌生长趋势和空白对照组基本一致, 表明非特异性卵黄

抗体对病原菌没有明显的抑制效果。

3 讨论

动物生产中抗生素的滥用或不合理使用导致了抗生素耐药细菌的产生, 这些耐药菌可以在动物和人体内转移, 对人类和动物的健康构成日益严重的威胁^[28]。病原菌对抗生素的耐药性和多重耐药菌的不断增加, 导致在与细菌感染的斗争中面临着抗生素匮乏的挑战。因此, 迫切需要开发一种新的抗生素替代品, 以应对日益严重细菌的耐药性问题。卵黄抗体具有特异性好、产量高、无残留、价廉易得、无明显毒副作用的特点, 可有效地治疗动物和人类的细菌感染^[29-30]。卵黄抗体是从禽类卵黄中提取的, 是一种天然的免疫球蛋白, 而鸡蛋作为一种普遍食用的食品, 被广泛认为是安全的。目前, 在关于卵黄抗体的研究中尚未发现有关卵黄抗体毒副作用的报道^[31-32]。卵黄抗体通常是针对特定病原体的, 对特定的病原



图版 II 免疫荧光电镜观察特异性卵黄抗体与致病菌的结合情况

1~3. 哈维氏弧菌; 4~6. 溶藻弧菌; 7~9. 副溶血性弧菌。标尺代表 50 μm (放大倍数为 200×)。

Plate II The binding of specific IgY to pathogenic bacteria observed by immunofluorescence electron microscopy

1-3. *V. harveyi*; 4-6. *V. alginolyticus*; 7-9. *V. parahemolyticus*. 1 cm on the scale represents 50 μm (magnification 200×).

体具有高度的特异性, 而不会对其他细菌或生物产生影响。此外, 卵黄抗体是一种被动免疫技术, 即通过动物摄入抗体来获得免疫保护, 而不是通过激活动物自身的免疫系统来产生抗体。因此, 相较于主动免疫, 被动免疫不太可能导致免疫过度反应或其他不良反应。尽管卵黄抗体通常被认为是相对安全的, 但其应用仍然需要考虑可能存在的风险, 例如病原跨物种的传播。为了降低这种风险, 卵黄抗体的生产过程需要严格的生产规范和质量控制措施, 以确保产品的安全性和有效性。例如, 可以采用以下方法: ①使用无特定病原体 (SPF) 的母鸡, 以确保母鸡不受病原体的感染。②在饲养过程中, 确保鸡群的健康状态, 定期进行健康检查。③对饲养环境、饮水和食物进行定期消毒, 以杀灭环境中可能存在的病原微生物。④在提取和纯化卵黄抗体的过程中, 采取有效的病原体去除措施, 以确保抗体的纯度和安全性。⑤通过巴氏消毒法对卵黄抗体进行处理, 进一步杀灭可能存在的病原体。这些措施可以有效地降低卵黄抗体生产过程中病原体跨物种传播的

风险, 从而保障卵黄抗体的安全性和有效性。

病害仍然是制约水产养殖业健康发展的关键问题。目前, 我国水产养殖业面临着多达 200 多种病害的严峻挑战, 其中常见病害亦有数十种, 在这些病害中, 细菌性疾病的发病率最高, 约占总病害的 57.63%, 紧随其后的是病毒性疾病, 其发病率约为 11.02%^[33]。卵黄抗体在水产养殖中的主要用于疾病的预防和治疗^[22, 34-36], 动物的促生长^[37-38]、疾病诊断^[39-41] 和水产品的保鲜^[42-43] 等方面。由于水生动物生活环境的多样性和复杂性, 使得细菌性疾病的暴发通常是由多种细菌的混合感染所引起的。因此, 单独使用某种特异性卵黄抗体可能无法达到预期的治疗效果。相比单一的卵黄抗体, 三联特异性卵黄抗体具有以下优势: ①广谱性, 可以同时识别并结合多种不同病原体, 提供更全面的保护, 对于治疗混合感染或多种病原体同时流行的情况尤为重要。②减少接种次数, 三联特异性卵黄抗体可以减少动物的接种次数, 一次接种就可以提供对多种病原体的免疫保护, 减少动物的应激。③降低成本, 三联卵黄抗体可

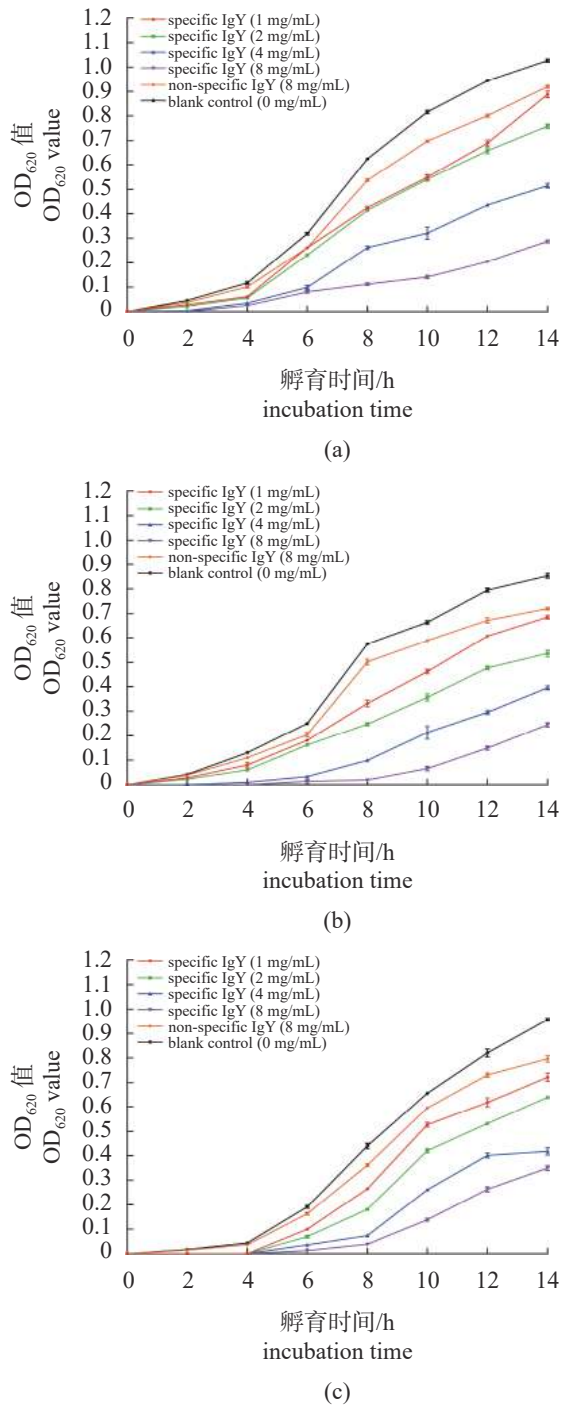


图4 特异性卵黄抗体对致病菌体外生长抑制效果

Fig. 4 The inhibitory effect of specific IgY on the growth of pathogenic bacteria *in vitro*

以在同一批免疫程序中制备,从而降低了不同单一卵黄抗体的制备和应用成本。

本实验以灭活的哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌作为抗原免疫蛋鸡,以制备抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌的三联特异性卵黄抗体,探究特异性卵黄抗体对这三种弧菌的体

外抑菌作用,为卵黄抗体作为抗生素替代品在水产病养殖中细菌混合感染的防治提供理论依据和实验基础。健康蛋鸡受到特定抗原刺激后,体内法氏囊的B细胞分化成为浆细胞,通过体液免疫应答分泌特异性抗体,通过血液循环转送至卵黄中累积,形成卵黄抗体^[16]。抗原初次免疫蛋鸡,免疫反应相对较弱,随着多次的加强免疫后,体内的记忆细胞会识别抗原,迅速增殖分化成浆细胞并产生大量特异性抗体,并且可持续较长时间。在本实验中,初次免疫蛋鸡后,卵黄中抗体效价较低,随着加强免疫后,在第3周抗体效价开始迅速上升,抗哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌的三联特异性卵黄抗体效价分别在初次免疫后的第6周和第7周达到峰值(1:51200),且持续约5周后效价开始明显降低。在Borges等^[44]和Shi等^[45]研究中,ELISA检测其制备的卵黄抗体效价,抗体趋势与本实验结果类似。

通过水稀释、盐析法从卵黄中分离纯化卵黄抗体,在还原条件下使用SDS-PAGE评估卵黄抗体分离纯化的效果。在水稀释法粗提抗体阶段,SDS-PAGE电泳图中可观察到明显的杂蛋白条带,随着两步盐析法的纯化进行,抗体中的杂蛋白逐渐减少,表明抗体纯度显著提高。此外,Western blot分析证实特异性卵黄抗体与抗原结合后,能够识别出抗体的重链和轻链,并显示出对应的蛋白条带。

为探究三联特异性卵黄抗体与病原菌的特异性结合效果,通过扫描电子显微镜和免疫荧光电镜观察特异性卵黄抗体与哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌的体外作用,两种电子显微镜的结果是互相验证、互相补充的。特异性卵黄抗体与病原菌具有很强的亲和力,表现出良好的特异性。在特异性卵黄抗体作用下,菌体之间大量聚集并黏附在一起,导致菌体细胞的完整性受到破坏,细胞壁出现褶皱与破损,从而有效抑制了细菌的体外生长和繁殖。相比之下,病原菌与非特异性卵黄抗体之间没有明显的亲和力,菌体细胞相对完整,表面光滑。有研究通过免疫荧光和扫描电子显微镜研究发现,特异性卵黄抗体能够引起细菌明显的凝集,破坏细菌细胞壁的完整性,损坏菌体的细胞膜,导致细菌活力下降,从而抑制细菌的生长^[46-48],这与本研究得到的结果一致。研究表明,特异性卵黄抗体可以对弧菌的菌体细胞结构产生影响,破坏其细胞壁的表面结构,

从而发挥其抑菌效果。

细菌的细胞壁不仅可以维持菌体的固有形态, 维持细胞的完整性, 保护细菌抵抗低渗环境, 还携带多种决定细菌抗原性的抗原决定簇^[49-50]。通过免疫反应产生的特异性卵黄抗体与特定病原体细胞壁表面的多个抗原决定簇发生特异性结合, 形成抗原-抗体复合物, 导致病原体的菌体凝集, 长时间形成的复合物聚集在一起, 可产生肉眼可见的沉淀。在液体培养基中, 特异性卵黄抗体分别与三种弧菌孵育培养后, 特异性卵黄抗体能够明显抑制哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌在液体培养基中的生长, 并随着培养时间的延长, 抑菌效果逐渐明显, 且特异性卵黄抗体的浓度与抑菌作用呈现出明显的剂量依赖性。相比之下, 非特异性卵黄抗体对三种弧菌的抑制效果较差, 细菌的生长速度与空白对照组基本相似。Kassim 等^[51]研究发现, 在液体培养基中, 相比非特异性卵黄抗体, 特异性卵黄抗体对副溶血性弧菌和创伤弧菌 (*V. vulnificus*) 的生长具有显著的抑制作用, 且呈现明显的剂量依赖性, 这与本实验的研究结果相似。特异性卵黄抗体与细菌孵育后, 导致菌体发生凝集并黏附在一起, 同时破坏菌体结构, 从而抑制细菌的生长繁殖, 并阻碍病原菌对细胞的黏附。

禁止将饲用抗生素用于动物生产已成为当下全球养殖行业发展的必然趋势^[52], 全面禁止抗生素不仅有助于提高水产品的质量和安全, 增加绿色优质产品的供给, 还能降低养殖成本, 提高水产品的市场竞争力, 并促进水产养殖业的健康可持续发展。在这一背景下, 卵黄抗体作为一种极具潜力的抗生素替代品, 展现出了广泛的应用前景和巨大的市场潜力。综上所述, 本实验制备的三联特异性卵黄抗体在体外实验中, 表现出对哈维氏弧菌、溶藻弧菌与副溶血性弧菌明显的抑制作用, 具有治疗哈维氏弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌引起的弧菌病的潜力。该研究结果为三联特异性卵黄抗体的制备和体外抑菌效果研究提供了理论支持, 同时也为水产养殖中细菌混合感染的防治提供了一种新的参考方案。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Santhana Lakshmi V, Ranjani S, Hemalatha S. Anti-bacterial activity of *Cymbopogon citratus* nanoparticles

against *Vibrio* species infecting aquatic organisms[J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 260: 106583.

- [2] Ranjani S, Parthasarathy P, Rameshkumar P, et al. Pungent anti-infective nanocolloids manipulate growth, biofilm formation, and CTX-M-15 gene expression in pathogens causing vibriosis[J]. *Aquaculture International*, 2021, 29(2): 859-869.
- [3] Bhotra T, Singh D V. Whole-genome sequence of *Vibrio alginolyticus* isolated from the mucus of the coral *Fungia danai* in the Andaman Sea, India[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(3): e00339-16.
- [4] Stalin N, Srinivasan P. Molecular characterization of antibiotic resistant *Vibrio harveyi* isolated from shrimp aquaculture environment in the South East Coast of India[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 97: 110-118.
- [5] Osei-Adjei G, Huang X X, Zhang Y Q. The extracellular proteases produced by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(5): 68.
- [6] Aly S M, Eissa A E, ElBanna N I, et al. Efficiency of monovalent and polyvalent *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio Parahaemolyticus* vaccines on the immune response and protection in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) against vibriosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 111: 145-151.
- [7] Jeria E, Oyanedel D, Rojas R, et al. Resistance of *Argopecten purpuratus* scallop larvae to vibriosis is associated with the front-loading of immune genes and enhanced antimicrobial response[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1150280.
- [8] Ye Y F, Xia M J, Mu C K, et al. Acute metabolic response of *Portunus trituberculatus* to *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Aquaculture*, 2016, 463: 201-208.
- [9] Nguyen H T, Nguyen T T T, Chen Y C, et al. Enhanced immune responses and effectiveness of refined outer membrane protein vaccines against *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(9): 1349-1358.
- [10] Silvaraj S, Md Yasin I S, Karim M M A, et al. Elucidating the efficacy of vaccination against vibriosis in *Lates calcarifer* using two recombinant protein vaccines containing the outer membrane protein K (r-OmpK) of *Vibrio alginolyticus* and the DNA chaperone J (r-DnaJ) of *Vibrio harveyi*[J]. *Vaccines*, 2020, 8(4): 660.
- [11] Han Y J, Jo A, Kim S W, et al. Multiplex PCR using

- YeaD* and 16S *rRNA* gene to identify major pathogens in vibriosis of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Genes & Genomics*, 2019, 41(1): 35-42.
- [12] Chen J M, Sun R X, Pan C G, *et al.* Antibiotics and food safety in aquaculture[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(43): 11908-11919.
- [13] Du Y, Hu X M, Miao L, *et al.* Current status and development prospects of aquatic vaccines[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 1040336.
- [14] Yuan X, Lv Z Q, Zhang Z Y, *et al.* A review of antibiotics, antibiotic resistant bacteria, and resistance genes in aquaculture: occurrence, contamination, and transmission[J]. *Toxics*, 2023, 11(5): 420.
- [15] Li X Y, Wang L L, Zhen Y H, *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6(1): 40.
- [16] Zhang L P, Lin L, Qin Z D. A review on the application of chicken immunoglobulin Y in aquaculture[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2024, 16(1): 536-551.
- [17] El-Kafrawy S A, Abbas A T, Oelkrug C, *et al.* IgY antibodies: the promising potential to overcome antibiotic resistance[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1065353.
- [18] 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.
- [19] Ge S K, Xu L, Li B, *et al.* Canine Parvovirus is diagnosed and neutralized by chicken IgY-scFv generated against the virus capsid protein[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51(1): 110.
- [20] Lee E N, Sunwoo H H, Menninen K, *et al.* *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*[J]. *Poultry Science*, 2002, 81(5): 632-641.
- [21] Wang F, Qiao W, Bao B, *et al.* Effect of IgY on periodontitis and halitosis induced by *Fusobacterium nucleatum*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(2): 311-320.
- [22] Hu B C, Yang X D, Guo E P, *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 and Agriculture*, 2019, 99(5): 2565-2571.
- [23] Kota R K, Reddy P N, Sreerama K. Application of IgY antibodies against staphylococcal protein A (SpA) of *Staphylococcus aureus* for detection and prophylactic functions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(21): 9387-9398.
- [24] Sanches R F, dos Santos Ferraro A C N, Marroni F E C, *et al.* Synergistic activity between beta-lactams and ige antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro[J]. *Molecular Immunology*, 2022, 148: 1-5.
- [25] Tobias F L, Garcia L N N, Kanashiro M M, *et al.* Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk[J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012, 43(2): 544-551.
- [26] Su H, Wei K M, Zhao M L, *et al.* Research note: a novel method for preparation of egg yolk immunoglobulin Y against *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Poultry Science*, 2023, 102(9): 102863.
- [27] 翟玥, 曲笑锋, 庞博, 等. 副溶血性弧菌高免卵黄抗体的制备和不同提纯方法效果的比较 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2017, 43(2): 441-445.
- Zhai Y, Qu X F, Pang B, *et al.* Preparation of high immunity yolk antibody against *Vibrio parahaemolyticus* and comparison of effectiveness between different extraction methods[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2017, 43(2): 441-445 (in Chinese).
- [28] Xu C M, Kong L Q, Gao H F, *et al.* A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 822689.
- [29] Lee L, Samardzic K, Wallach M, *et al.* Immunoglobulin Y for potential diagnostic and therapeutic applications in infectious diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 696003.
- [30] Pereira E P V, van Tilburg M F, Florean E O P T, *et al.* Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: a review[J]. *International Immunopharmacology*, 2019, 73: 293-303.
- [31] Thu H M, Myat T W, Win M M, *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY) for prophylaxis and treatment of rotavirus diarrhea in human and animal neonates: a concise review[J]. *Korean journal for food science of animal resources*, 2017, 37(1): 1.
- [32] Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo F C Jr., *et al.* Oral

- passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2013, 9(5): 1039-1048.
- [33] 俞晶晶, 萧枪枪, 郑晨阳, 等. 卵黄抗体在水产养殖病害防治中的应用[J]. *水产养殖*, 2022, 43(02): 44-50.
Yu J J, Xiao Q Q, Zheng C Y, *et al.* Application of yolk antibody in the prevention and control of aquaculture diseases[J]. *Journal of Aquaculture*, 2022, 43(02): 44-50 (in Chinese).
- [34] Guo Y, Ma Y B, Endri H, *et al.* Protective effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against *Spiroplasma eriocheiris* infection in Chinese mitten crab[J]. *Aquaculture*, 2023, 572: 739488.
- [35] Liu X, Xiao H, Chao J, *et al.* Polyvalent passive vaccine candidates from egg yolk antibodies (IgY) of important outer membrane proteins (PF1380 and ExbB) of *Pseudomonas fluorescens* in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 143: 109211.
- [36] Nakamura R, Pedrosa-Gerasmio I R, Alenton R 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.
- [37] 郭培红, 田丹阳, 孙丙耀, 等. 抗 IL-1 β 卵黄抗体对大菱鲂生长性能、生理生化指标的影响[J]. *饲料工业*, 2021, 42(04): 58-64.
Guo P H, Tian D Y, Sun B Y, *et al.* Effects of anti-IL-1 β egg yolk immunoglobulin on growth performance, physiological and biochemical indexes of *Scophthalmus Maximus*[J]. *Feed Industry*, 2021, 42(04): 58-64 (in Chinese).
- [38] 李英英, 宋铁英, 江兴龙, 等. 鱼用功能性卵黄粉对鳢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]. *Feed Industry*, 2018, 39(16): 19-23 (in Chinese).
- [39] Empey Campora C, Hokama Y, Yabusaki K, *et al.* Development of an enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of ciguatoxin in fish tissue using chicken immunoglobulin Y[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2008, 22(4): 239-245.
- [40] Eto S F, Fernandes D C, Moraes A C, *et al.* Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 153-160.
- [41] Zhang L P, Li D F, Liu L G, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus[J]. *Journal of virological methods*, 2015, 221: 39-45.
- [42] Xu Y, Lin H, Sui J, *et al.* Effects of specific egg yolk antibody (IgY) on the quality and shelf life of refrigerated *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, 92(6): 1267-1272.
- [43] Zhang Q, Lin H, Sui J, *et al.* Effects of Fab'fragments of specific egg yolk antibody (IgY - Fab') against *Shewanella putrefaciens* on the preservation of refrigerated turbot[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(1): 136-140.
- [44] Borges I P, Silva M F, Santiago F M, *et al.* Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* venom[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 333-342.
- [45] Shi H Y, Zhu J, Zou B Y, *et al.* Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95: 1734-1742.
- [46] Xu L, Xu Y P, He L Y, *et al.* Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 108-119.
- [47] Xu L, Che J, Xu Y P, *et al.* Oral administration of microencapsulated egg yolk immunoglobulin (IgY) in turbot (*Scophthalmus maximus*) to combat against *Edwardsiella tarda* 2CDM001 infections[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 609-620.
- [48] Zhang M X, Geng H J, Tariq Javed M, *et al.* Passive protection of Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) against *Vibrio harveyi* infection using chicken egg yolk immunoglobulins (IgY)[J]. *Aquaculture*, 2021, 532: 736009.
- [49] Brandtzaeg P, Fjellanger I, Gjeruldsen S T. Adsorption

- of immunoglobulin A onto oral bacteria *in vivo*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1968, 96(1): 242-249.
- [50] Jia Y Y, Yu C G, Fan J H, *et al.* Alterations in the cell wall of *Rhodococcus biphenylivorans* under norfloxacin stress[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 554957.
- [51] Kassim N, Mtenga A B, Shim W B, *et al.* The *in vitro* and *in vivo* efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 22(10): 1423-1431.
- [52] Zhang Y J, Meng Z N, Li S L, *et al.* Two antimicrobial peptides derived from *Bacillus* and their properties[J]. *Molecules*, 2023, 28(23): 7899.

Preparation of anti-*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* triple egg yolk antibody and evaluation of its effect *in vitro*

ZHANG Linpeng, YANG Shiyi, BAI Yanhan, LIU Lihan,
TAO Junjie, LIN Li*, QIN Zhendong*

(Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: To study the bacteriostatic effect of triple yolk antibody (IgY) against *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus in vitro*, the triple inactivated vaccine of *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* was prepared and the laying hens were immunized. The eggs were collected for the preparation of IgY and their titer, purity and specificity were determined. By immunofluorescence, scanning electron microscopy and *in vitro* antibacterial experiments, the *in vitro* antibacterial effect of the prepared triple IgY on three species of *Vibrio* was preliminarily investigated. The results showed that the ELISA detected a titer of up to 1 : 51 200 for the IgY, which it maintained for 5 weeks; SDS-PAGE analysis of the isolated and purified IgY showed that the protein impurity bands in the IgY were gradually reduced, and the purity increased with purification. Immunofluorescence and immunoblotting experiments demonstrated high specificity of binding of the specific IgY to the antigen. Further observation by scanning electron microscopy showed that, compared to *Vibrio* treated with non-specific IgY, those treated with specific IgY adhered to each other, the surface of the bacterial cells appeared rough, and the cell wall was damaged. *In vitro* bacterial inhibition assays showed that the specific IgY significantly inhibited *Vibrio* in a dose-dependent manner. In summary, the triple IgY prepared in this study was able to specifically bind to *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus*, and it was found through *in vitro* experiments that the IgY could play an inhibitory role by destroying the integrity of the bacterial cells through the agglutination and adhesion.

Key words: aquaculture; *Vibrio harveyi*; *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio parahaemolyticus*; egg yolk antibody; bacteriostasis

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com

Funding projects: Key Projects of Colleges and Universities in Guangdong Province (Rural Revitalization) (2020ZDZX1026); Jieyang City (municipal) to Introduce Innovation and Entrepreneurship Team and Leading Talent Project (src003)