

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20190704001

http://www.yykxjz.cn/

袁雪梅, 吕孙建, 施伟达, 杭小英, 刘莉, 吴颖蕾. 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

Yuan XM, Lv SJ, Shi WD, Hang XY, Liu L, Wu YL. Isolation and egg-yolk antibody preparation of *Micropterus salmoides* rhabdovirus. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 151–157

## 大口黑鲈弹状病毒的分离培养 及其卵黄抗体的制备\*

袁雪梅 吕孙建 施伟达 杭小英 刘莉<sup>①</sup> 吴颖蕾

(农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室 浙江省鱼类健康与营养

重点实验室 浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

**摘要** 本研究从爆发性死亡的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)鱼苗病样中分离培养 1 株大口黑鲈弹状病毒(*M. salmoides* rhabdovirus, MSRVR)毒株, 采用甲醛灭活大口黑鲈弹状病毒, 制备佐剂灭活疫苗, 免疫产蛋鸡, 收集高免蛋, 制备 MSRVR 卵黄抗体, 测定其效价、中和效果及对病毒复制和宿主细胞内凝集素基因(*intelectin*)表达的影响。结果显示, 成功利用草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)卵巢细胞株 CO 细胞分离培养大口黑鲈鱼弹状病毒, 并用于佐剂灭活疫苗的制备; MSRVR 佐剂灭活疫苗免疫蛋鸡, 成功获得 MSRVR 的卵黄抗体, 效价为 1:256, 稀释度为 1:64 时的中和病毒的作用最为明显, 中和作用率达 38.29%以上, 病毒核酸拷贝数明显降低。同时, 还可上调细胞内凝集素的表达。研究表明, 特异性卵黄抗体对大口黑鲈弹状病毒具有明显的中和效果, 为后续卵黄抗体作为免疫制剂的应用奠定了基础。

**关键词** 大口黑鲈; 弹状病毒; 卵黄抗体; 病毒中和

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)03-0151-07

大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)俗称加州鲈, 原产于美国加利福尼亚州密西西比河水系, 肉质鲜美、在市场上很受欢迎, 加之具有生长迅速、易起捕、适温范围广、耐低氧能力强等特点, 一直深受养殖户的欢迎(樊佳佳等, 2019)。我国年产量超过 30 万 t, 是全球产量最高的国家(邓国成等, 2011)。近年来, 大口黑鲈已逐渐成为跑道式循环水养殖的主要养殖品种。但无论是传统的高密度养殖, 还是跑道式集中圈养模式, 都存在着疫病快速传播的潜在危险。其中, 病毒性病害的爆发, 常造成严重的经济损失。弹状病

毒(Rhabdovirus)为一种单股不分节段的负链 RNA 病毒, 种类较多, 包括 175 种以上的成员, 可感染脊椎动物、无脊椎动物和植物。鱼类弹状病毒因宿主广、毒株种类多、毒力强等特点, 对各种淡水和海水鱼造成了严重危害(Zhang *et al.*, 2018)。近几年, 在大口黑鲈苗种培育及养殖早期流行一种可引起大口黑鲈鱼苗大量死亡的疾病, 给鲈鱼养殖业带来巨大的经济损失。雷燕等(2015)结合流行病学调查及分子生物学鉴定, 确认引起广东省佛山市一大口黑鲈养殖池塘鱼种暴发性死亡的疾病为弹状病毒病, 其病原为弹状病

\* 湖州市自然科学基金项目(2018YZ09)和浙江省省属科研院所扶持专项项目(2019YSZX002)共同资助 [This work was supported by Natural Science Foundation of Huzhou City of China (2018YZ09), and Scientific Research Institution Support Special Project of Zhejiang Province (2019YSZX002)]. 袁雪梅, E-mail: 179506607@qq.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 刘莉, 研究员, E-mail: liuli6655@hotmail.com

收稿日期: 2019-07-04, 收修改稿日期: 2019-07-30

毒。寻找敏感细胞是病毒体外培养的关键,而病毒的体外培养又是后续研究的基础。目前,已报道的用于大口黑鲈弹状病毒体外培养的细胞仅有大口黑鲈皮肤(LBS)细胞一种(Gao *et al.*, 2018)。

卵黄抗体(IgY)是指从免疫禽蛋中提取出的针对特定抗原的抗体,具有化学性质稳定、产量高、成本低、特异性强且无任何毒副作用的优势;由于与鱼类种系发生距离远,不会发生交叉血清学反应。卵黄抗体对某些动物疫病具有明显治疗和紧急预防作用;纯化后的卵黄抗体还可用于病毒的检测(陈斌等, 2005)。卵黄抗体应用于水生动物疾病的预防和治疗屡见报道。特异性卵黄抗体可较好地保护感染白斑综合症病毒的斑节对虾,显著提高斑节对虾的存活率(Kumaran *et al.*, 2010),用抗溶藻弧菌卵黄抗体拌喂感染溶藻弧菌的鲍鱼,可显著降低鲍鱼的死亡率(Wu *et al.*, 2011)。Sunwoo 等(2010)发现,特异性卵黄抗体能抑制大肠杆菌(*Escherichia coli* 987P)的生长。程娜(2014)研究发现,抗鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)卵黄抗体可明显提高感染鳗利斯顿氏菌香鱼(*Plecoglossus altivelis*)的存活率。由于大口黑鲈弹状病毒主要危害5 cm 以下的鲈鱼苗种,而这一阶段的鱼苗免疫系统发育不完善,主动免疫预防难以实现,加之发病急,病程短,以抗体作为被动免疫的预防措施更具有生产实践意义。本研究在成功分离培养大口黑鲈弹状病毒的基础上,针对大口黑鲈病毒制备卵黄抗体,研究其对大口黑鲈弹状病毒的中和作用,为大口黑鲈弹状病毒病的防治与诊断试剂的开发提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、细胞及实验动物

弹状病毒感染的大口黑鲈鱼苗病样采自浙江省湖州市某苗种场,草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)卵巢细胞株(CO)由实验室保存。180 日龄的健康蛋鸡由浙江湖州杨家埠鸡场提供,10 只进行免疫,5 只用作阴性对照。

### 1.2 主要试剂

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司(美国);细胞培养基 M199、胎牛血清及双抗均购自 GIBCO 公司;TRIZOL 总 RNA 提取试剂、Ex Taq DNA 聚合酶和 pGEM-T 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司(日本);反转录和定量 PCR 试剂购自 TOYOBO 公司(日本);2×Taq PCR Master Mix 购自天根生化科技(北京)有限公司;辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗鸡抗体、TMB 显色试剂盒、MTT 细胞增殖和细胞毒性

检测试剂盒均购自碧云天生物技术公司(上海);引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂均为国产分析纯级试剂。

### 1.3 大口黑鲈感染弹状病毒检测及分离培养

取 10 尾患病大口黑鲈鱼苗置于冰上研磨,采用 TRIZOL 试剂提取组织总 RNA,参考雷燕等(2015)的方法,进行 RT-PCR 检测,扩增产物送苏州金唯智生物科技有限公司测序。经 PCR 检测后,取感染 MSR/V 的大口黑鲈鱼苗,匀浆后离心,取上清液,过滤除菌,滤液即为粗提的病毒原液。采用草鱼卵巢细胞株 CO 细胞作为大口黑鲈弹状病毒的敏感细胞,以含 10%胎牛血清的 M199 完全培养基培养 CO 细胞至汇片 60%~80%时,上述病毒粗提液用 M199 基础培养基 1:5 倍稀释后感染细胞,吸附 1.5~2 h 后,吸出未吸附病毒液,添加 M199 维持液继续培养 48~72 h,出现细胞病变 50%以上,收获病毒的细胞培养物,置于 -80℃ 保存备用。此外,根据已公布的 MSR/V 核酸序列(GenBank No: MK397811)设计引物,扩增特异性产物构建质粒,用于制备定量检测病毒核酸的标准品。同时,设计用于荧光定量 PCR 检测病毒核酸、内凝集素(*intelectin*)和内参的引物。所用引物具体信息见表 1。

### 1.4 大口黑鲈弹状病毒灭活疫苗的制备及免疫

病毒的细胞培养物冻融、离心,取上清液,加入甲醛使终浓度为 0.5%,密封后置于 65℃ 灭活 2 h,每 30 min 摇匀 1 次。冷却至室温,加入青霉素和链霉素(双抗浓度为 100 μg/ml),分装封口,4℃ 保存。将灭活的大口黑鲈弹状病毒分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂按 1:1 体积比混合,完全乳化后得弗氏完全佐剂乳化疫苗和弗氏不完全佐剂乳化疫苗,4℃ 保存备用。

用上述制备的佐剂乳化疫苗采用胸肌多点注射的方式,免疫 180~190 日龄的产蛋鸡。分别于 1、7、14 和 28 d 免疫,共免疫 4 次,每次免疫 1 ml/只。第 1 次采用弗氏完全佐剂乳化疫苗免疫,其他时间点用弗氏不完全佐剂乳化疫苗免疫。免疫 5 周后,从第 35 天开始收集鸡蛋,每天收集免疫鸡所产的鸡蛋,总共收集 20 d。同时,以注射 PBS 作为对照组,免疫程序与实验组相同。

### 1.5 卵黄抗体的制备及效价测定

收集的鸡蛋经表面消毒,在无菌条件下取蛋黄倒入烧杯中,加入 8 倍体积的乙酸-乙酸钠缓冲液(pH 5.2),搅拌 10 min,4℃ 沉淀过夜,吸取上清液,10000 r/min

表1 本研究所用引物  
Tab.1 Primers used in this study

引物名 Primer name	引物序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Amplicon size (bp)	用途 Purpose
MSRV-F	ATAAGGGTAGTTGAGAAGAAG	55	372	PCR
MSRV-R	CTTCTTGTTGCTCTTCTTAAA			
MSRV-F1	CTGCTGTGTTAATTTTGCTCTTGGTCCGA TTTTTCGGAGCCTTACCCGCTGTTTGTTC	58	1386	标准质粒 制备
MSRV-R1	GATGGTGGTGGTGGTGGCTGCCGC TCACTCCAGTTCCCACC			
MSRV-F2	AGCAGCATCACCAGCCACATC	58	185	Real-time PCR
MSRV-R2	CGTCCGTCGCTTGACTCAATT			
Intelectin-F	AGGCGGATGGACTCTTGTGG	58	109	
Intelectin-R	TTCAGGCAGGTTCTGGTCGTT			
$\beta$ -actin-F	CATCCTCCGCTGGACTTGGCT	58	257	
$\beta$ -actin-R	CCTCTGGGCACCTGAACCTCT			

离心 15 min, 收集上清液, 加入饱和硫酸铵沉淀抗体蛋白, 12000 r/min 离心, 收集沉淀, 超纯水重悬, 透析去除卵黄抗体中残留的盐离子。采用 SDS-PAGE 检测卵黄抗体纯度, BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。

采用 ELISA 测定卵黄抗体效价。首先, 制备 MSRV 蛋白, 在 MSRV 病毒液中加入适量 RIPA (含 1 mmol/L PMSF), 混匀后, 置于冰上 30 min, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液即为病毒蛋白。病毒蛋白用 PBS 稀释后铺板, 每孔 100  $\mu$ l, 4°C 包被过夜; 之后, PBST 洗涤 3 次后, 加入倍比稀释的卵黄抗体, 每孔 100  $\mu$ l, 37°C 孵育 1 h, 洗涤 3 次后, 再加入羊抗鸡二抗, 于 37°C 孵育 1 h, 洗涤 3 次后, 加 TMB 底物显色, 最后, 加入 10% 硫酸溶液终止反应。

## 1.6 卵黄抗体的抗病毒效果及其对内凝集素基因 (*intelectin*) 表达的影响

**1.6.1 卵黄抗体对病毒的中和作用** 首先, 测定病毒半数细胞感染量 (TCID<sub>50</sub>), 即 MSRV 病毒原液进行 10 倍稀释, 分别接种 CO 细胞, 每个稀释度设 8 个重复。24°C 培养 96 h, 记录病变细胞数和未病变细胞数, 按 Reed-Muech 法计算 TCID<sub>50</sub>。

以每孔 100 个 TCID<sub>50</sub> 病毒量与倍比稀释的卵黄抗体混匀, 24°C 作用 2 h 后接种细胞, 同时, 设正常细胞孔对照及 100 TCID<sub>50</sub>/孔、0.1 TCID<sub>50</sub>/孔的病毒对照, 当 100 TCID<sub>50</sub>/孔全部病变, 而 0.1 TCID<sub>50</sub>/孔中无病变时, 用 MTT 法检测细胞存活量, 按公式计算中和作用率:

作用率 (%) = [(给药组平均值 - 病毒对照平均值) / (正常细胞对照组平均值 - 病毒对照平均值)] × 100%

**1.6.2 卵黄抗体对弹状病毒复制的影响** 参考刘珍等 (2016) 的方法制备标准品, 使用引物 MSRV-F1/MSRV-R1 扩增病毒核酸特异性片段, PCR 产物经纯化后与载体 pGEM-T 连接, 将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 提取质粒, 并测序验证。测定重组质粒 DNA 浓度, 换算成拷贝数作为标准品原液。以 10 倍梯度稀释的标准质粒为模板, MSRV-F2 和 MSRV-R2 为引物, 进行 Real-time PCR 扩增。反应参数: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 19 s, 共 40 个循环。得出计算病毒核酸拷贝数的标准曲线。

卵黄抗体与等体积的病毒液混合, 24°C 作用 2 h 后接种细胞, 同时, 设置病毒对照和正常细胞对照。于接种后第 6、12、24、48 和 72 小时收集细胞病毒液, TRIZOL 提取总 RNA, 反转录参照 TOYOBO 公司的 “ReverTra Ace qPCR RT Master Mix” 试剂盒合成 cDNA。使用引物 MSRV-F2/MSRV-R2 对样品 cDNA 进行 Real-time PCR 扩增, 通过标准曲线换算得到样品中病毒 RNA 的拷贝数。

**1.6.3 卵黄抗体对 CO 细胞中 *intelectin* 表达的影响** 按照 1.6.2 所述步骤处理样品, 得到的样品 cDNA 分别用引物 *intelectin*-F/*intelectin*-R 和  $\beta$ -actin-F/ $\beta$ -actin-R 进行 Real-time PCR 扩增, 反应程序同 1.6.2。得到的数据利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算实验组 *intelectin* 的相对表达量。

## 1.7 统计分析

采用软件 SPSS 16.0 的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对各组数据进行差异分析,  $P < 0.05$  为显著性

差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 弹状病毒核酸检测及分离培养

患病大口黑鲈鱼苗的主要症状表现为停止摄食, 水面漫游, 打转, 体色发黑, 鳃和腹部充血(图 1a)。采用特异性引物对患病鱼组织核酸进行 PCR 检测, 扩增片段大小与预期 372 bp 相符(图 1b)。

利用患病鱼组织制备的病毒粗提液接种 CO 细胞后, 24 h 开始出现细胞病变, 表现为细胞收缩变圆, 聚集成团, 出现明显的空斑(图 2)。细胞培养物经 RT-PCR 检测, 同样可扩增出大口黑鲈弹状病毒的特异性片段。

### 2.2 卵黄抗体制备及浓度、纯度和效价测定

收集免疫后的鸡蛋蛋黄, 纯化后得到的卵黄抗体浓度为 1.8 mg/ml, 经 SDS-PAGE 检测, 从图 3 可以看出, 在 50~75 kDa 和 25~37 kDa 之间有明显的条带, 与卵黄抗体轻链和重链大小预期相符(He *et al.*, 2011)。ELISA 测得卵黄抗体的效价为 1 : 256。

### 2.3 卵黄抗体的中和作用及对病毒复制的影响

病毒 TCID<sub>50</sub> 经测定为  $10^{4.12}$ 。卵黄抗体倍比稀释后, 与病毒作用后接种 CO 细胞, 用 MTT 法检测卵黄抗体中和作用率, 结果显示, 1/64 倍稀释的卵黄抗体对病毒的中和作用最为明显, 中和作用率为 38.29% 以上。

为定量测定病毒复制的核酸拷贝数, 制备了荧光

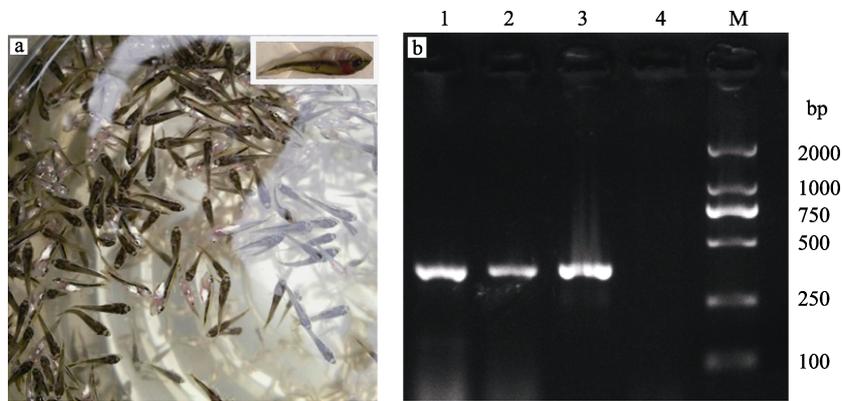


图 1 大口黑鲈弹状病毒的临床症状(a)与 PCR 检测结果(b)

Fig. 1 Clinical symptoms (a) and MSRVR PCR products (b) of diseased *M. salmoides*

1~3: 病鱼样品 Diseased *M. salmoide* samples; 4: 阴性对照 Negative control; M: DNA Marker DL2000

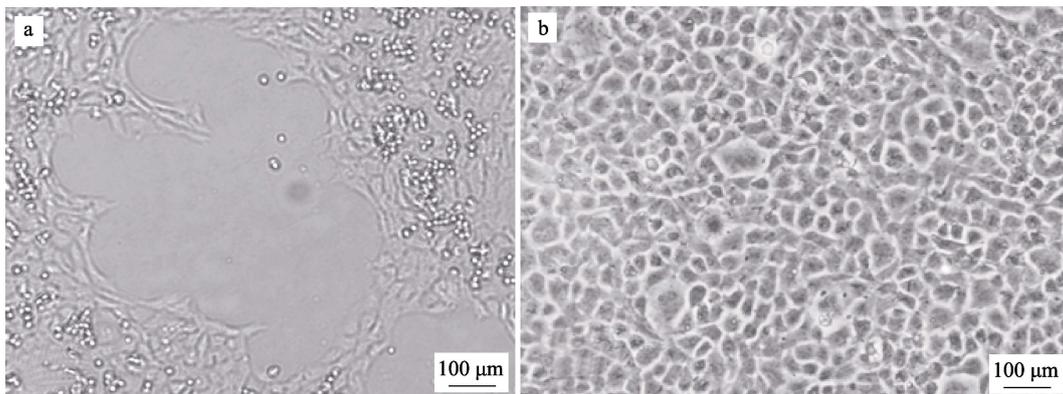


图 2 大口黑鲈弹状病毒在草鱼卵巢细胞株(CO)上的病变情况

Fig. 2 Cytopathic effect of CO cell monolayer inoculated with diseased fish tissue homogenate filtrate

a: 接种病毒 2 d 的 CO 细胞; b: 正常的 CO 细胞

a: Cytopathic effect of CO cells 2 days post-infection; b: Normal CO cell monolayer

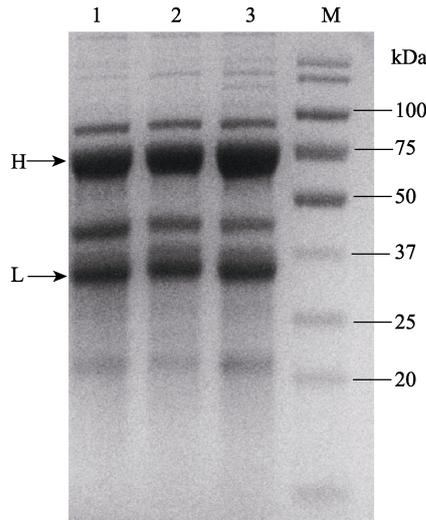


图 3 卵黄抗体的 SDS-PAGE 分析  
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of IgY

1~3: IgY; M: 蛋白分子量标准 Protein maker

定量 PCR 的标准曲线, 其  $R^2$  为 0.9983, 引物的扩增效率为 103%。在此基础上, 应用 Real-time PCR 方法检测中和实验组及对照组的病毒复制情况, 结果显示, 病毒与卵黄抗体中和作用后接种 CO 细胞, 于 6、12、24、48 和 72 h 5 个时间点收集的细胞培养物, 测得的病毒 RNA 拷贝数均显著低于病毒对照组 (图 4), 其中, 第 12 小时中和实验组病毒拷贝数仅为病毒对照组的 0.003 倍。

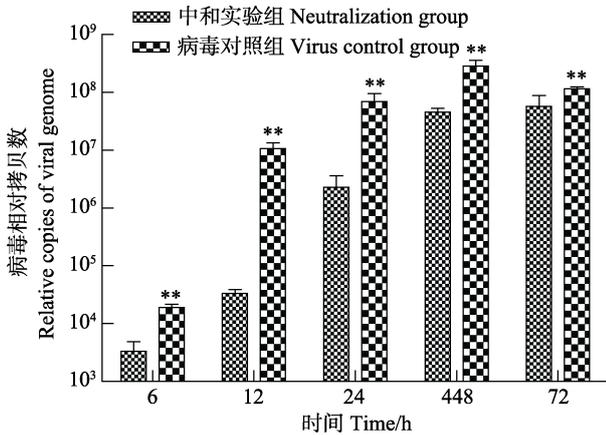


图 4 卵黄抗体对弹状病毒复制的影响

Fig. 4 Neutralization of relative virus copies of MSRV using egg-yolk antibody

\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ ), 下同

\*\* indicate highly significant differences, the same as below

#### 2.4 卵黄抗体对 CO 细胞 *intelectin* 基因表达的影响

采用 Real-time PCR 方法检测中和实验组及细胞对照组不同时间点的 CO 细胞中 *intelectin* 基因的表达

水平。结果显示, 中和实验组 *intelectin* 基因的表达量在 5 个时间点均高于细胞对照组, 其中, 72 h 时, 中和实验组 *intelectin* 的表达量达到细胞对照组的 10 倍 (图 5)。

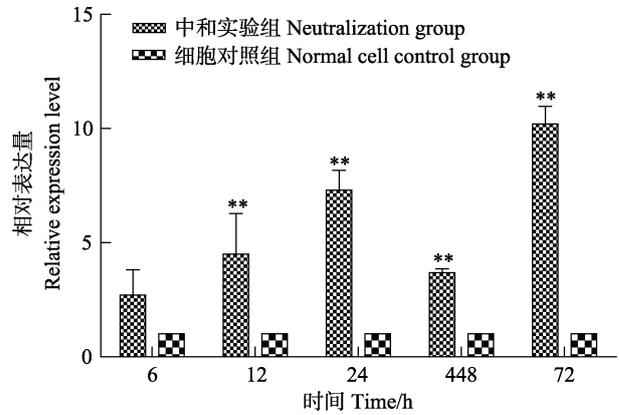


图 5 卵黄抗体对 CO 细胞 *intelectin* 表达的影响

Fig. 5 Relative expression of *intelectin* mRNA of MSRV challenged CO neutralized with egg-yolk antibody

### 3 讨论

近年来, 大口黑鲈弹状病毒在大口黑鲈苗种培育及养殖早期流行, 严重时, 80%池塘发病, 死亡率高, 短时间内可高达 90%, 经济损失巨大。研究利用 CO 细胞分离培养大口黑鲈弹状病毒, 得到了较好的效果, 病毒能在 CO 细胞上稳定传代, 利用荧光定量 PCR 测定 CO 细胞培养的病毒 RNA 拷贝数, 可达  $10^9$  copies/ml 以上, 收获的细胞病毒液经浸泡感染大口黑鲈鱼苗, 能复制出与自然发病鱼相似的症状。目前, 用于大口黑鲈弹状病毒体外培养的细胞鲜有报道。Gao 等(2018)利用大口黑鲈皮肤(LBS)细胞培养 MSRV, 可产生明显的细胞病变效应, 应用 Real-time PCR 方法检测, 感染细胞 24 h 时病毒 RNA 相对表达量为感染 6 h 时的 70 多倍。在应用 CO 细胞感染 MSRV 病毒时, 检测到感染 24 h 时病毒 RNA 相对表达量为 6 h 时的 800 倍以上, 说明, CO 细胞较 LBS 细胞更适合 MSRV 的复制增殖。

卵黄抗体因具备无毒副作用和特异性高等特点, 被广泛用于人和动物的疾病控制和治疗(Zhen *et al*, 2008)。本研究发现, 大口黑鲈弹状病毒与特异性卵黄抗体作用后, 在 CO 细胞中的复制水平明显降低, 说明, 特异性卵黄抗体对大口黑鲈弹状病毒具有中和作用, 但其抗体效价低于已报道的抗病毒卵黄抗体水平。王建梅等(2012)用盐析法粗提制备的抗犬瘟热卵黄抗体, 其效价最高可达 1 : 819。张述斌等(2013)

建立了一种用水稀释反复冻溶法、氯仿萃取法与冷乙醇沉淀法相结合提取鸡新城疫卵黄抗体的方法, 效价可达到 1 : 2048。雷丹等(2018)应用水稀释法提取抗猪流行性腹泻病毒(PEDV)变异株卵黄抗体, 其效价为 1 : 12800。分析本研究中卵黄抗体效价低的原因, 可能是免疫程序和抗体提取纯化方法不够理想, 还需进一步优化。此外, 本研究还发现, 5 个时间点中和实验组病毒 RNA 拷贝数较病毒对照组下降水平不一, 其中, 12 h 时下降 1000 倍, 表明卵黄抗体除了可以直接中和病毒, 还可能在病毒复制增殖过程中发挥作用, 其机制有待进一步研究。

内凝集素作为凝集素家族的一员, 是一种新发现的分泌型凝集素。本研究中和实验组细胞的 *intelectin* 表达水平较正常细胞组有所升高, 提示, 卵黄抗体在免疫防御或应答方面发挥作用。李媛(2016)研究发现, 迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)特异性 IgY 能够增强大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)头肾巨噬细胞的吞噬活性, 刺激大菱鲂非特异性免疫相关酶(溶菌酶、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶)的产生, 还能增强这些酶的活性, 也说明, 卵黄抗体具有刺激和调节机体免疫功能的作用。目前, 水生动物有关 *intelectin* 的报道很少, Chang 等(2007)报道, 在草鱼体内经脂多糖诱导后 *intelectin* 表达水平显著上调。Lin 等(2009)报道, 在感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的肝脏中 *intelectin* 表达水平上调。本实验室前期研究发现, 草鱼在接种草鱼出血病灭活苗早期, 肾脏中 *intelectin* 基因表达显著上调(奕志娟等, 2015)。Chen 等(2018)报道, 斑马鱼(*Danio rerio*) *intelectin* 基因 *zITLN1*、*zITLN2* 和 *zITLN3* 可以识别细菌细胞壁的主要成分, 从而能结合细菌并引发细菌的凝集。目前, 尚未见卵黄抗体刺激 *intelectin* 基因上调的相关报道, 其上调与病毒复制的相关性及其机理有待进一步研究。

本研究成功建立了大口黑鲈弹状病毒的体外培养和卵黄抗体制备方法, 明确了卵黄抗体的抗病毒中和作用, 为进一步开发用于弹状病毒免疫防治的免疫制剂奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献

- Chang MX, Nie P. *Intelectin* gene from the grass carp *Ctenopharyngodon idella*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 23(1): 128–140
- Chen B, Yang ZH. Mechanism and prospects of egg yolk immunoglobulin (IgY). *Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine*, 2005, 30(1): 9–10 [陈斌, 杨志华. 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的作用机理及应用前景. 浙江畜牧兽医, 2005, 30(1): 9–10]
- Chen L, Yan J, Shi J, *et al.* Zebrafish *intelectin 1 (zITLN1)* plays a role in the innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 83: 96–103
- Cheng N. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental *Listonella anguillarum* infection in sweetfish (*Plecoglossus altivelis*). Master's Thesis of Ningbo University, 2014 [程娜. 抗鳃利斯顿氏菌鸡卵黄抗体对致病香鱼保护作用的研究. 宁波大学硕士研究生学位论文, 2014]
- Deng GC, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Diseases and prevention of largemouth bass cultured in ponds. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(18): 102–103, 137 [邓国成, 白俊杰, 李胜杰, 等. 大口黑鲈池塘养殖常见病害及其防治. 广东农业科学, 2011, 38(18): 102–103, 137]
- Fan JJ, Bai JJ, Li SJ, *et al.* Analysis on genetic diversity of three breeding populations of largemouth bass using formulated feeds. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 57–64 [樊佳佳, 白俊杰, 李胜杰, 等. 驯食配合饲料的大口黑鲈 3 个选育世代的遗传多样性分析. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 57–64]
- Gao EB, Chen GF. *Micropterus salmoides* rhabdovirus (MSRV) infection induced apoptosis and activated interferon signaling pathway in largemouth bass skin cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 76: 161–166
- He YN, Bjorkman PJ. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(30): 12431–12436
- Kumaran T, Michaelbabu M, Selvaraj T, *et al.* Production of anti WSSV IgY edible antibody using herbal immunoadjuvant *Asparagus racemosus* and its immunological influence against WSSV infection in *Penaeus monodon*. *Journal of Aquaculture Feed Science and Nutrition*, 2010, 2(1): 1–5
- Lei D, Li AQ, Luo SX, *et al.* Preparation, purification and activity factors analysis of IgY against variant of porcine epidemic diarrhea virus. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018, 45(8): 2293–2302 [雷丹, 李安琪, 罗素贤, 等. 抗猪流行性腹泻病毒变异株卵黄抗体的制备、纯化及其活性影响因素的研究. 中国畜牧兽医, 2018, 45(8): 2293–2302]
- Lei Y, Qi RR, Cui LB, *et al.* Diagnosis of rhabdovirus disease in juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Journal of Dalian Ocean University*, 2015, 30(3): 305–308 [雷燕, 戚瑞荣, 崔龙波, 等. 大口黑鲈鱼种弹状病毒病的诊断. 大连海洋大学学报, 2015, 30(3): 305–308]
- Li Y. Passive protective effect of specific egg yolk antibodies against *Edwardsiella tarda* in turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2016 [李媛. 迟缓爱德华氏菌特异性卵黄抗体对大菱鲈的被动保护研究. 大连理工大学硕士研究生学位论文, 2016]
- Lin B, Cao Z, Su P, *et al.* Characterization and comparative analyses of zebrafish *intelectins*: Highly conserved sequences, diversified structures and functions. *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 396–405
- Liu Z, Zhang QL, Wan XY, *et al.* Development of real-time PCR assay for detecting microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* and the application in shrimp samples with

- different growth rates. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(2): 119–126 [刘珍, 张庆利, 万晓媛, 等. 虾肝肠胞虫 (*Enterocytozoon hepatopenaei*) 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及对虾样品的检测. *渔业科学进展*, 2016, 37(2): 119–126]
- Sunwoo HH, Lee EN, Gujral N, *et al.* Growth inhibition of *Escherichia coli* 987P by neutralizing IgY antibodies. *Open Immunology Journal*, 2010, 3: 1–8
- Wang JM, Yang J, Luo JF, *et al.* Preparation and titer detection of immunoglobulin of yolk against canine distemper. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2012, 30(3): 327–332 [王建梅, 杨娇, 罗继芬, 等. 抗犬瘟热高免卵黄抗体的制备及效价的检测. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2012, 30(3): 327–332]
- Wu CJ, Wang H, Chan YL, *et al.* Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(4–5): 1042–1048
- Yi ZJ, Hao GJ, Yuan XM, *et al.* Inactivated vaccine for hemorrhage of grass carp up-regulates the expressions of major immune-related genes in spleen of grass carp. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(5): 177–181 [奕志娟, 郝贵杰, 袁雪梅, 等. 草鱼出血病灭活疫苗上调草鱼脾细胞主要免疫分子的表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(5): 177–181]
- Zhang LJ, Li NQ, Lin Q, *et al.* An avirulent *Micropterus salmoides* rhabdovirus vaccine candidate protects Chinese perch against rhabdovirus infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2018, 77: 474–480
- Zhang SB, Xue ZL, Zhang HB, *et al.* Study on extraction of chicken ND-IgY combining with water dilution repeated freezing and dissolving method, chloroform extraction and cold ethanol precipitation. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 32(1): 11–12, 14 [张述斌, 薛掌林, 张洪波, 等. 利用水稀释反复冻溶法、氯仿萃取法与冷乙醇沉淀法相结合进行鸡新城疫卵黄抗体提取的试验研究. *畜牧兽医杂志*, 2013, 32(1): 11–12, 14]
- Zhen Y, Jin L, Guo J, *et al.* Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1–2): 126–133

(编辑 马瑾艳)

## Isolation and Egg-Yolk Antibody Preparation of *Micropterus salmoides* Rhabdovirus

YUAN Xuemei, LV Sunjian, SHI Weida, HANG Xiaoying, LIU Li<sup>①</sup>, WU Yinglei

(Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

**Abstract** The largemouth bass *Micropterus salmoides* has been widely cultured in China due to its considerable economic value. Recently, the species suffered from serious *M. salmoides* rhabdovirus (MSRV) disease during the juvenile phase, particularly in aquaculture conditions. In this study, a strain of *M. salmoides* rhabdovirus isolated from dying juvenile fish was cultured in a grass carp ovary (CO) cell line. To take advantage of passive immunity, we explored anti-MSRV immunoglobulin Y (IgY) by discontinuously immunization on laying hens with a formalin-killed vaccine of MSRV. The antibody was purified by saturated ammonium sulfate, and displayed virus resistance with an ELISA antibody titer of 1 : 256 detected. The bioactivity of anti-MSRV IgY was tested simultaneously after being added to a CO cell line incubated with MSRV. This antibody showed antiviral activity, with 38.29% of neutralizing effectiveness detected at a dilution of 1 : 64. The RNA copies of MSRV in the test group were clearly fewer in number compared with those of members of a control group. By the florescent real-time quantitative PCR, the intracellular lectin experienced significantly up-regulated pick-up to nearly 10-fold at 72 h compared with the control group. In conclusion, we successfully isolated a strain of MRSV and cultured it in a CO cell line. Anti-MSRV IgY prepared with vaccinations of inactive virus displayed antiviral activity in this study, laying a foundation for the application of yolk antibodies as an immune preparation.

**Key words** *Micropterus salmoides*; Rhabdovirus; Egg-yolk antibody; Virus neutralization

① Corresponding author: LIU Li, E-mail: liuli6655@hotmail.com