

文章编号: 1000-0615(2007)04-0472-06

鳃弧菌 L-18 株的限铁条件和铁调节外膜蛋白的免疫效果

高 磊^{1,2}, 李 健², 王 群², 刘 淇²

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 利用 Western-blot 技术, 对鳃弧菌 L-18 株的 OMPs 和 IROMPs 的免疫反应性进行了分析, 并通过免疫牙鲆比较二者免疫保护力的差异, 以期从 IROMPs 方向探索开发鳃弧菌新型鱼用疫苗, 并为研究其免疫原理提供重要的科学依据。结果表明, 培养基中加入不同浓度的联铁剂, 鳃弧菌 L-18 株的生长和铁载体的表达出现规律性变化, 其中加入 $100 \sim 130 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 2'-联吡啶为最适合限铁条件, 此时铁载体的表达量最高且生长受抑制程度较小。在此条件下, 菌株表达出 74.3 ku 和 77.4 ku 的 IROMPs, 其中 77.4 ku 蛋白具有免疫反应性, 为重要抗原。用全菌灭活疫苗、OMP、IROMPs 分别腹腔注射免疫牙鲆 7 周后攻毒, IROMPs 疫苗的相对免疫保护力达到 75.9%, 远高于 OMP 疫苗的 51.8%。相对于 OMP, IROMPs 的抗体效价显著提高, 接近全菌疫苗组的水平, 而血清杀菌活力没有显著变化。

关键词: 鳃弧菌; 铁调节外膜蛋白; 牙鲆

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

Iron-restricted condition and the immune efficacy of iron-regulated outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* L-18

GAO Lei^{1,2}, LI Jian², WANG Qun², LIU Qi²

(1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fishery Resources of the Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao 266071, China)

Abstract: *Vibrio anguillarum* is a common pathogen of marine fishes, which expresses a kind of specific iron-uptake system when infected. The iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) of *Vibrio anguillarum* have been studied for its expression and composition, but not for the immune efficacy on fish yet. The immunoreactivity of outer membrane proteins (OMP) and IROMPs of *Vibrio anguillarum* L-18 were analyzed with Western-blot in this study, and the difference of immune efficacy of OMP and IROMPs was determined through immunizing flounder *Paralichthys olivaceus*. We found that the growth and the output of siderophore of L-18 were associated with the concentration of 2, 2'-dipyridyl (a kind of iron chelator) in media TSB. $100 \sim 130 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2, 2'-dipyridyl in TSB was confirmed to be the most proper iron-restricted condition, in which the

收稿日期: 2006-11-23

资助项目: 科技部科研院所社会公益研究专项(2004DIB4J165); 山东省科技发展计划项目(2006GG2205005)

作者简介: 高 磊(1982-), 男, 安徽凤阳人, 硕士研究生, 主要从事鱼用疫苗研究。Tel: 13646481785, E-mail: opiece2006@163.com

通讯作者: 李 健, Tel: 0532-85830183; E-mail: Lijian@ysfri.ac.cn

growth of L-18 hadn't been restrained strongly and the output of siderophore had reached the top. Under this iron-restricted condition, L-18 expressed 74.3 ku and 77.4 ku IROMPs. The 77.4 ku protein, which was considered to be a important antigen, showed immunoreactivity clearly in Western-blot analysis. After immunization through intraperitoneal injection for 7 weeks, the cumulative mortality of *P. olivaceus* showed different values among formalin-killed whole-cell vaccine group, OMPs group and IROMPs group. The relative percent survival (RPS) of IROMPs vaccine reached 75.9%, higher than 51.8% of OMPs vaccine significantly. The antibody titre of IROMPs group advanced significantly compared with OMPs group, nearly the same as the whole-cell group, but the survival index (SI) of it in serum had no obvious change.

Key words: *Vibrio anguillarum*; iron-regulated outer membrane proteins(IROMPs); *Paralichthys olivaceus*

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是海水养殖动物中较为常见的致病菌,曾在世界范围内引起养殖鱼类的流行病爆发,如鲑鱼(*Salmo salar*)、虹鳟(*Salmo gairdneri*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)等。在长期的进化过程中,鳃弧菌发展出特有的铁摄取系统,该系统可以从宿主鱼体内高亲和力铁离子结合蛋白中抢夺铁离子,从而战胜宿主并引发鱼类弧菌病的发生^[1]。研究表明,鳃弧菌在宿主体内摄取铁的过程中,会分泌出铁载体,并表达铁调节外膜蛋白(IROMPs)。IROMPs往往与细菌的致病性密切相关^[2]。前人已经作出关于杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)^[3]、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitides*)^[4]、多杀巴斯德杆菌(*Pasteurella haemolytica*)^[5]以及溶血性曼氏杆菌(*Pasteurella haemolytica*)^[6]等菌种的IROMPs的研究。杀鲑气单胞菌和多杀巴斯德杆菌的IROMPs被证明具有较好的免疫能力,而其他的菌种,包括多数关于鳃弧菌IROMPs的研究多为IROMPs表达及组成的考察,并未涉及IROMPs的免疫力。因此,能否用鳃弧菌的IROMPs作为抗原,诱导机体产生相应的抗体,进而封闭细菌的摄铁或转铁结合位点,达到抑制细菌在机体内繁殖的目的,是研制新型高效疫苗的一个切入点。

本文考察了鳃弧菌 L-18 株的限铁生长条件、铁载体表达,以及 IROMPs 的表达和对牙鲆的免疫保护力,为开发新型疫苗提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

细菌菌株 鳃弧菌 L-18 株由本实验室分离自山东省即墨养殖基地的患病牙鲆,血清型 O1

型,毒力较强。

试验用鱼 300 尾健康牙鲆,平均体重为(56.4±1.5)g,购自中国水产科学研究院黄海水产研究所麦岛实验基地,水温 21~24℃,免疫接种前后,一切按照常规的养殖程序管理。

试验用兔 新西兰兔,体重 1352 g,购于山东省青岛市市立医院,常规养殖。

1.2 培养基

普通培养基 TSB(中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司)。

限铁培养基 TSB 中加入不同浓度的 2,2'-联吡啶(20、50、100、130、150、200 μmol·L⁻¹)。

1.3 限铁条件和铁载体检测试验

L-18 株接种于上述各培养基中,37℃振荡培养 20 h,751 分光光度计观察生长情况(测 A490 值),测定 L-18 最适合的限铁条件。重复试验 3 次,取平均值。

采用 Arnou^[7]法特异性检测儿茶酚类铁载体。于 510 nm 下测 OD 值,按照标准曲线测算浓度。重复试验 3 次,取平均值。

1.4 OMPs 和 IROMPs 的提取

参考 Kokka 等^[8]的方法(即 Sarkosyl 法)做适当改动:培养并收集细菌,以 200 W 超声波破碎约 5 min 后离心收集上清,添加去污剂 N-lauroylsarcosinate (Sigma)使其质量浓度为 1.2 g·mL⁻¹,混匀,4℃隔夜静置。40 000 r·min⁻¹(HITACHI 70P-72)4℃离心 40 min,下层沉淀即为外膜蛋白,蒸馏水重悬。Bradford 法测蛋白浓度,分装后-20℃保存备用。

1.5 OMPs 和 IROMPs 的 SDS-PAGE 和 WESTERN-BLOT

采用不连续垂直凝胶电泳,5%浓缩胶,12%分离胶,浓缩胶部分恒压 70 V 约 20 min,分离胶

部分恒压 130 V 约 80 min,考马斯亮兰 R-250 染色。凝胶分析软件 Gelpro32 分析结果。

Western-blot 方法参照文献[9],其中一抗使用限铁生长的鳗弧菌全菌灭活疫苗免疫新西兰兔的血清获得,二抗为商品辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG,DAB 显色。

1.6 对牙鲆的主动免疫

疫苗 OMPs 和 IROMPs 的浓度为 $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;L-18 全菌灭活苗的浓度为 $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ 。在确定疫苗的安全性后,将以上制备的三种疫苗分别腹腔注射接种 100 尾健康牙鲆,每尾接种量 0.2 mL。4 周后二次免疫。免疫期间每周取各组采血用鱼 5 尾,尾静脉取血,每尾 0.5 ~ 0.7 mL,室温放置 4 h 后离心取血清。在二次免疫后 4 周,取每组牙鲆 60 尾,各分为二个平行,并设一个未免疫的对照组,用鳗弧菌腹腔注射攻毒,浓度为 $5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$,每尾剂量 0.2 mL。攻毒后 3 周正常养殖,每天观察死亡情况,记录死亡数,并计算相对免疫保护率(relative percent survival, RPS):

$$\text{RPS}(\%) = \left(1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}\right) \times 100$$

1.7 血清杀菌试验

参照李春猛^[10]的方法:调节鳗弧菌浓度为 $1.5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$,等量菌悬液分别与等量血清混合,37 °C 孵育,分别于 1、2、3、4 h 取样,适当稀释后,分别涂布 2216E 平板 5 个,并设空白对照。所有平板置 28 °C 培养 20 ~ 24 h,进行菌落计数,分别计算血清杀菌活力(SI):

$$\text{SI}(\%) = \left(\frac{\text{取样时刻的细菌数}}{\text{零时刻的细菌数}}\right) \times 100$$

1.8 统计分析

利用统计软件 SPSS11.0 对试验结果进行单因素方差分析(One-way ANOVA),免疫指标以 $\bar{X} \pm \text{SD}(n=5)$ 计。

2 结果

2.1 L-18 株限铁培养基的确定和铁载体的检测

试验结果表明,在含有不同浓度 2,2'-联吡啶的 TSB 培养基中,鳗弧菌 L-18 株的生长表现出一定的规律(图 1)。在加入少量联铁试剂后,L-18 株的生长出现上升趋势;继续加入联铁试剂,生长开始受到抑制;当 2,2'-联吡啶的浓度达到 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,L-18 株几乎没有生长。

Arnow 法检测鳗弧菌 L-18 株铁载体的表达结果见图 1。在正常的 TSB 培养基中,L-18 株表达了少量的铁载体。在加入少量 2,2'-联吡啶时,L-18 的铁载体含量反而有减少趋势;持续加入 2,2'-联吡啶,铁载体含量迅速达到高峰;当 2,2'-联吡啶达到抑制 L-18 生长的浓度时,铁载体浓度又逐渐降低。

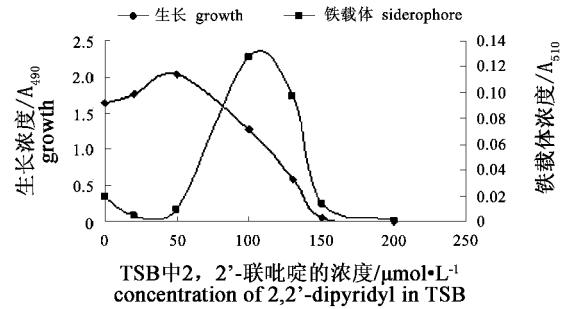


图 1 鳗弧菌 L-18 株的限铁生长及铁载体检测

Fig.1 The growth and the detection of siderophore of *V. anguillarum* L-18 in TSB under iron-restricted condition

2.2 IROMPs 的表达

SDS-PAGE 试验结果表明,在 TSB 中加入 $130 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶,可以诱导鳗弧菌 L-18 株表达出约 74.3 ku 的低丰度外膜蛋白和 77.4 ku 的高丰度外膜蛋白(图 2)。由图谱可知 L-18 株 OMPs 和 IROMPs 都表达出了如下蛋白:17.2 ku、19.7 ku、22.4 ku、36.5 ku、38.2 ku、42.5 ku、46.2 ku,其中以 38.2 ku 蛋白含量最高。

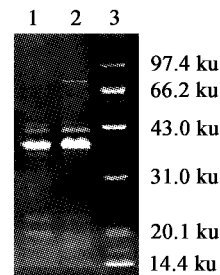


图 2 鳗弧菌 L-18 株铁调节外膜蛋白的 SDS-PAGE 试验

Fig.2 Comparison of SDS-PAGE profiles of OMPs and IROMPs extracts of *V. anguillarum* L-18
1. OMPs;2. IROMPs;3. Biotinylated molecular weight standards in ku

2.3 IROMPs 的免疫反应性

限铁培养的 L-18 灭活疫苗制备的抗血清可与 OMPs 和 IROMPs 中的 36.5 ku、38.2 ku、42.5 ku、46.2 ku 蛋白带反应,而 OMPs 中的 17.2 ku、

19.7 ku、22.4 ku 蛋白带,以及 IROMPs 中的 77.4 ku 蛋白带也可与抗血清反应。另外在 OMPs 和 IROMPs 印迹图谱中还出现了一条电泳图谱中所没有的或者表达非常弱的带:33.6 ku,而且 OMPs 单独表达了约 26.5 ku、32.8 ku、58.2 ku 的带。空白试验表明,不加一抗直接与二抗反应不会出现明显的印迹带(图 3)。

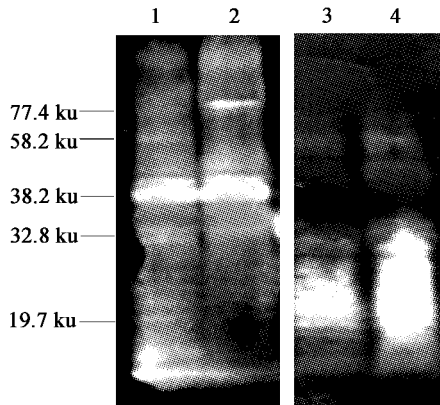


图 3 鳃弧菌 L-18 株 OMPs 和 IROMPs 的免疫印迹图谱
Fig.3 Western-blots of OMPs and IROMPs of *V. anguillarum*

L-18 reacted with iron-restricted whole-sell antiserum
1. OMPs;2. IROMPs;3. OMPs reacted with goat anti-rabbit IgG;
4. IROMPs reacted with goat anti-rabbit IgG

2.4 主动免疫

以鳃弧菌 L-18 株的全菌灭活疫苗、OMPs、IROMPs 分别免疫牙鲆,在免疫期间所取得牙鲆的血清对 L-18 株表现出了不同程度和规律的凝集(图 4)。与对照组相比,全菌疫苗组在第三周即表达出了较高的抗体效价;OMPs 疫苗组虽然持续增长,但一直较慢;而 IROMPs 组则在第三周也达到了较高水平,并且与全菌组差异不显著($P > 0.05$)。

免疫后用 L-18 株攻毒,三种疫苗表现出了不同的保护力,累计死亡率见表 1,对照组和其他各组间差异极显著($P < 0.05$),全菌疫苗组和 IROMPs 疫苗组间无显著差异($P > 0.05$),OMPs 疫苗组则和其他两个疫苗组间有显著差异($0.01 < P < 0.05$)。各疫苗 RPS 分别约为:全菌疫苗 79.3%,OMPs 疫苗 51.8%,IROMPs 疫苗 75.9%。

2.5 血清杀菌活力

经多次实验测定的各组血清对鳃弧菌杀菌活力在 3 h 时最高,图 5 表示的是每次采样牙鲆血清在 3 h 时对鳃弧菌的杀菌指数(SI)。由图可

知,从第三周开始,全菌疫苗组表现了比对照组明显高的活力,并与对照组有显著差异($P < 0.05$),这种状态一直维持到免疫结束;OMPs 组和 IROMPs 组则在第三周和第四周具有比对照组高的杀菌活力,但从第五周开始,其杀菌活力基本上与对照组持平。

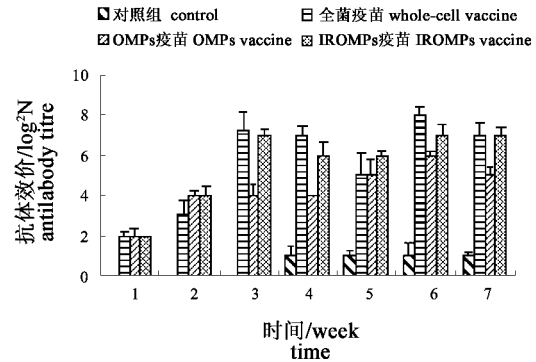


图 4 试验牙鲆血清抗体效价的比较(n=5)

Fig.4 Comparison of the antibody titre of sera at different times after immunization(n=5)

表 1 鳃弧菌 L-18 株攻毒后的平均累计死亡率
Tab.1 Mean cumulative mortality after challenge with *V. anguillarum* L-18 $\bar{X} \pm SD$ (n=5)

组别 group	平均累计死亡率(%) cumulative mortality
对照 control	96.60 ± 4.78
全菌疫苗 <i>V. anguillarum</i> vaccine	20.00 ± 5.64
OMPs 疫苗 <i>V. anguillarum</i> OMPs vaccine	46.63 ± 7.07
IROMPs 疫苗 <i>V. anguillarum</i> IROMPs vaccine	23.35 ± 2.41

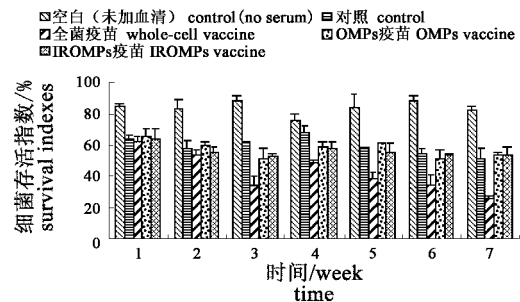


图 5 试验牙鲆血清在 3h 对鳃弧菌的杀菌活力比较(n=5)

Fig.5 Comparison of bactericidal activity in *Paralichthys olivaceus* serum to *V. anguillarum* at 3 hours(n=5)

3 讨论

铁是许多微生物生长必需的营养物质^[11],但在有氧以及中性、碱性 pH 环境中铁是不可利用的,这是因为其水解、聚合,形成了不溶的氢氧化物^[12]。在脊椎动物的胞外液体中,其铁由铁结合蛋白粘连,比如血清中的铁转运蛋白和分泌物中的乳铁转运蛋白,所以自由可用的铁的浓度就更少了^[13]。针对铁的特性,为解决利用铁的问题,许多微生物表达了高亲和力的铁摄取系统,一些学者对于不同菌种铁摄取系统做出了研究:脑膜炎奈瑟球菌的 70、94 ku IROMPs 被证明具有免疫原性^[4];多杀巴斯德杆菌的 IROMPs 是 76、84 和 94 ku^[5];溶血性曼氏杆菌的 IROMPs 则是 70、77 和 100 ku^[6]。

关于鳃弧菌的铁摄取系统,前人的研究多集中于分析其铁载体和 IROMPs 的表达及组分,有关鳃弧菌 IROMPs 的免疫原性和免疫保护力的研究还未见报道。本文首次对鳃弧菌 IROMPs 的免疫原性和免疫保护力作出了探讨,结果表明,鳃弧菌 L-18 株在适宜的限铁条件下可以分泌儿茶酚类铁载体,并且表达出约 74.3 ku 和 77.4 ku 的外膜蛋白,应当属于染色体基因调控铁调节系统的 O1 型鳃弧菌^[14];77.4 ku 的 IROMPs 具有免疫反应性,很可能也具有免疫原性。使用含 77.4 ku 的 OMPs 免疫牙鲆,可以显著提高 OMPs 的免疫保护力。

3.1 L-18 株的限铁条件

在限铁条件的试验中,发现当联铁剂在一定的浓度范围内时,L-18 株的生长、铁载体的分泌量大约与 TSB 培养基中 2,2'-联吡啶的浓度成反比。只有一点反常:当加入约 20 ~ 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶时,菌株反而生长更旺盛,而铁载体的分泌量则明显降低,此现象尚未见报道,原因不明。

以 2,2'-联吡啶作为联铁剂,螯合 TSB 培养基中的铁,促使细菌为夺取铁而产生铁载体和铁调节外膜蛋白,当 2,2'-联吡啶达到 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,由于其联铁能力过强,细菌的铁摄取系统已经无法把铁从 2,2'-联吡啶中夺取,因此无法生长。结合铁载体检测和外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱,加入 100 ~ 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶时产生最多的铁载体和 IROMPs,说明对于鳃弧菌 L-18 株,TSB

+ 100 ~ 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶为其最受限铁生长环境。以往研究表明,不同菌种的最受限铁环境不同,比如杀鲑气单胞菌为 TSB + 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶^[3],兔多杀巴氏杆菌为其适合的培养基加入 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶^[15]。这就说明不同菌种对于铁离子浓度的要求是有差异的。在与本实验相关的另外一个试验中,发现副溶血弧菌 X12 株在含 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2'-联吡啶的 TSB 中仍然可以生长,电泳结果表明其 IROMPs 是把原有的数种蛋白加强表达,说明不同的菌种表达 IROMPs 的方法和能力也有差异。因此选择适宜的限铁生长环境,对于制作含病原菌 IROMPs 的疫苗是非常重要的。

3.2 L-18 株 OMPs 和 IROMPs 的免疫原性

以限铁培养的 L-18 灭活疫苗制备的抗血清,含有机体对菌体中所有刺激性抗原应答而产生的抗体。在本试验中,组成 OMPs 的数种蛋白几乎都与抗血清发生了反应,说明鳃弧菌 L-18 株的 OMPs 是重要的抗原。类似的结论在其他菌种中也有报道^[6,15-16]。作为在 IROMPs 中新增表达的 77.4 ku 蛋白,与抗血清有较强的反应,表明此种蛋白是 L-18 株在限铁条件下表达的一种重要的蛋白,具有很好的免疫反应性。可以推测在免疫印迹中与 77.4 ku 蛋白反应的抗体是由抗原中的 77.4 ku 蛋白刺激机体产生的,因此这种蛋白很可能具有较强的免疫原性,是细菌重要的抗原。

结合对牙鲆的主动免疫试验结果,IROMPs 比 OMPs 多表达出了一种抗原,而其免疫保护力明显增强。因此,在抗原的免疫原性与其刺激所产生抗体的免疫保护力之间是否存在对应关系;如果抗原的免疫原性越强,对应抗体的保护力就越强,是否可以建立二者之间的线性关系,从而据此较为简单地评价疫苗的优劣,还值得今后研究。

3.3 L-18 株 IROMPs 对牙鲆的免疫力

在本试验中,L-18 株 OMPs 的免疫保护率显著低于全菌灭活疫苗的免疫保护率。其抗体效价和血清杀菌试验均表明,不管是特异性免疫还是非特异性免疫,L-18 株的 OMPs 的免疫力都比全菌灭活疫苗弱,原因可能是失去了 LPS 和鞭毛抗原等可以对机体产生免疫刺激的抗原,OMPs 单独对机体的刺激已不能达到全菌对机体刺激的程度。当联铁剂加入培养基促使 L-18 株产生 77.4 ku 蛋白后,此 IROMPs 对牙鲆的免疫保护率发生

了显著变化,达到了 75.9%,高于 OMPs 的 51.8%。虽然其血清杀菌活力与 OMPs 差异不显著,但抗体效价却大幅度提高,更接近于全菌灭活疫苗的趋势,表明 IROMPs 中的 77.4 ku 蛋白提高了 OMPs 的特异性免疫力。类似的结论也曾在其他菌中得到:Hirst 等^[3]研究表明,杀鲑气单胞菌的 IROMPs 比 OMPs 具有更好的免疫保护力,其对大西洋鲑的 RPS 分别为 69.6%和 36.5%;顾宏伟^[15]也认为,多杀巴斯德杆菌对小鼠的免疫力为:IROMPs 免疫组 > 全菌免疫组 > OMPs 免疫组。可以初步认为鳎弧菌 L-18 株的 IROMPs 对于牙鲆具有很好的免疫力,而且相对于 OMPs 其主要是通过提高鱼体特异性免疫能力来增强免疫保护力。以后的研究将针对于比较限铁培养和正常培养的鳎弧菌全菌灭活疫苗对水产动物的免疫能力,以及不同株或者不同血清型鳎弧菌的 IROMPs 的交叉反应和免疫交叉保护力的比较。

本试验结果表明,鳎弧菌 L-18 株的 IROMPs 是一种良好的免疫原,与 OMPs 相比能够起到更好的免疫保护效果。建议在生产鳎弧菌疫苗的过程中,培养菌体时应加入适量联铁剂,以促进其铁摄取系统的表达,从而加强疫苗的免疫效果。如果应用基因工程技术,使得此种 IROMPs 高效表达,可能会得到比全菌灭活疫苗更高效、更安全的新颖疫苗。因此,从铁摄取系统出发,阻断细菌对铁的摄取,从而达到免疫或治疗效果,从理论上为水产养殖鱼类细菌病的防治提供了崭新的思路。

参考文献:

- [1] 王雪,安利国,袁金铎. 鳎弧菌铁吸收系统的毒力作用研究进展[J]. 水产科学, 2006, 25(3): 161-162.
- [2] Ratledge C, Dover L G. Iron metabolism in pathogenic bacteria [J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 881-941.
- [3] Hirst I D, Ellis A E. Iron-regulated outer membrane proteins of *Aeromonas salmonicida* are important protective antigens in Atlantic salmon against furunculosis [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4:29-45.
- [4] Black T R, Dyer D W, Thompson M K, et al. Human immune response to iron-repressible outer membrane proteins of *Neisseria meningitides* [J]. Infection and Immunity, 1986, 54(3): 710-713.
- [5] Keumhwa C K, Samuel K, Maheswaran, et al. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of *in vivo* *Pasteurella multocida* [J]. Vet Microbiol, 1991, 28: 75-92.
- [6] Confer A W, McCraw R D, Janet A, et al. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* [J]. Vet Immunol and Immunopathol, 1995, 47: 101-110.
- [7] Arnow L E. Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures [J]. Journal of Biological Chemistry, 1937, 118: 531-537.
- [8] Kokka R P, Vedros N A, Janda J M. Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutination surface array protein-positive and surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* [J]. Clin Microbi, 1990, 28(10): 2240-2247.
- [9] Walker J M. The protein protocols handbook [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002, 317-319.
- [10] 李春猛,战文斌,马牲,等. 中国对虾血淋巴抗菌活力的测定 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(4): 599-603.
- [11] Neilands J B. Microbial iron compounds [J]. Ann Rev Biochem, 1981, 50: 715-731.
- [12] Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160:47-56.
- [13] Bullen J J, Rogers H J, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1978, 80:1.
- [14] Lemos M L, Sailinas P, Toranzo A E, et al. Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum* [J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170: 1920-1925.
- [15] 顾宏伟. 兔多杀性巴氏杆菌铁调节外膜蛋白的免疫原性、表位及耐药性分析 [D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2004.
- [16] Filatova T N, Gamzulina L N. The isolation and immunochemical characteristics of the basic iron-regulated protein in meningococci [J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 1997, (2): 24-29.