

文章编号 :1000 - 0615( 2006 )04 - 0538 - 06

## 溶藻弧菌外膜蛋白( Va-OMP )的免疫原性及免疫保护性

黄志坚 , 何建国

( 中山大学生命科学院 , 广东 广州 510275 )

**摘要** 利用初步制备的溶藻弧菌外膜蛋白( outer membrane protein of *Vibrio alginolyticus* , Va-OMP )、溶藻弧菌蛋白分子量 58kD 外膜蛋白( Va-OMP<sub>58</sub> )和溶藻弧菌( *Vibrio alginolyticus* , Va )灭活菌苗、溶藻弧菌脂多糖( lipopolysaccharides of *Vibrio alginolyticus* , Va-LPS )菌苗等进行主动保护性和被动保护性的实验比较, Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 免疫组小鼠免疫后用活菌攻击, 免疫保护率为 62.5% ~ 86.7% , 而 Va-LPS 组和 Va 灭活菌苗组的免疫保护率为 50% ~ 62.5% , 对照组的免疫保护率仅为 6.7% 。用不同抗血清免疫小鼠, 活菌攻击后, Va-OMP 组存活率达到 53.3% 和 66.7% , Va-OMP<sub>58</sub> 组次之, 存活率为 40% 和 50% , Va 灭活菌组的存活率为 33.3% 和 46.7% , 对照组为 13.3% 。与对照组相比较, Va-OMP 组差异较显著, 保护效果较好。溶藻弧菌外膜蛋白和蛋白分子量 58 kD 外膜蛋白的保护性效果高于溶藻弧菌灭活菌苗和溶藻弧菌脂多糖的保护性效果, 证明外膜蛋白( outer membrane protein , OMP )具有较强的免疫原性。迟发性超敏反应试验也证明, OMP 能诱发变态反应, 间接证明 OMP 具有较强的引起细胞介导免疫反应的能力。因此实验证明, Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 是能在小鼠产生体液免疫和细胞介导免疫的保护性抗原。

**关键词** 溶藻弧菌 ; 外膜蛋白 ; 免疫原性 ; 免疫保护性

中图分类号 S 941 文献标识码 :A

## Immunogenicity and immunoprotection of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus*

HUANG Zhi-jian , HE Jian-guo

( School of Life Sciences , Sun Yat-sen University , Guangzhou 510275 , China )

**Abstract** : Outer membrane protein( OMP ) is the main member of outer membrane , which is the unique structure of Gram-negative bacterium and plays great role in life function of bacterium. However , few researches were reported about immunogenicity and immunoprotection of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* ( Va-OMP ). In this paper , we prepared four vaccines about *V. alginolyticus* ( Va ) and outer membrane protein of *V. alginolyticus* . Comparing active and passive immunoprotection of outer membrane protein of *V. alginolyticus* , 58 kD of outer membrane protein of *V. alginolyticus* ( Va-OMP<sub>58</sub> ) , inactive *V. alginolyticus* and lipopolysaccharides of *V. alginolyticus* ( Va-LPS ) vaccine , the survival percentage of group Va-OMP and group Va-OMP<sub>58</sub> was between 62.5% - 86.7% . However , the survival percentage of group Va-LPS and group inactive Va was between 50% - 62.5% . After being immunized with antiserum and challenged by Va , the survival percentage of group Va-OMP was 53.3% and 66.7% . It showed that Va-OMP vaccine and Va-OMP<sub>58</sub> vaccine had higher immunogenicity than inactive vaccine and Va-LPS vaccine in mice. Moreover , outer membrane protein( OMP ) can induce hypersensitivity reaction in mice by delayed-type hypersensitivity( DTH ) test.

收稿日期 2005-12-12

资助项目 : 国家“ 863 ”计划基金资助项目( 2001AA622020 ) ; 广东省科技厅资助项目( A3050201 )

作者简介 : 黄志坚( 1970 - ) , 男 , 广东番禺人 , 博士 , 讲师 , 主要从事水生经济动物疾病病原和防治及免疫学研究。 E-mail : lsshzhj@mail.sysu.edu.cn ; Tel : 020 - 84113793

通讯作者 : 何建国 , Tel : 020 - 84110976 , E-mail : lsbr05@zsu.edu.cn

All the results showed that Va-OMP may be the protective antigen which is capable of inducing both humoral immunity and cell-mediated immunity (CMI) in mice. The immunoprotection of OMP in *Epinephelus fario* is in process. The experiment provided the theory base for vaccine preparation of *V. alginolyticus*. It hopes that Va-OMP<sub>58</sub> may be the protective antigen of *V. alginolyticus* and further be a candidate of the subunit vaccine.

**Key words:** *Vibrio alginolyticus*; outer membrane proteins; immunogenicity; immunoprotection

近年来,我国海水养殖业发展迅速,网箱养殖石斑鱼规模也不断扩大。养殖海区网箱数量增多,养殖密度增大,养殖水域环境逐渐恶化,疾病的危害日益严重。石斑鱼疾病病原主要包括细菌、病毒和寄生虫等,国内外有所报道<sup>[1-3]</sup>。细菌病是石斑鱼养殖中的主要病害之一,严重时死亡率高达70%~80%,造成巨大的经济损失。我们在广东省各地进行流行病学调查,从患病鲑点石斑鱼(*Epinephelus fario*)分离了数株细菌,经细菌学常规鉴定、细菌自动和半自动鉴定系统鉴定和人工感染及回归感染试验,确认溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)能引起鲑点石斑鱼细菌性疾病<sup>[4-6]</sup>。人们研究了不同种类的菌苗以预防和治疗细菌性疾病。目前,对于溶藻弧菌感染的防治主要是利用抗生素和减毒、灭活疫苗。抗生素的长期使用易使鱼类产生耐药性,而且抗生素的残留会通过食物链对人类造成危害。减毒疫苗的安全性难以掌握。在众多种细菌菌苗中,较常用的为灭活的全菌体菌苗,但因为制备过程中抗原活性容易受到破坏,而且残留的其它杂质可能会使鱼体出现炎症而死亡,内毒素容易产生副作用,具有不完善性。另外,许多学者利用脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)作为抗原免疫动物,但由于LPS菌苗的毒性,具有极高程度的副作用,且需要不同LPS血清型混合以进行有效治疗。因此人们一直都在试图寻找能针对不同血清型的具有共同保护性抗原的成分,研制能保留免疫原性,而无副作用的亚单位疫苗。

外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)作为革兰氏阴性菌特有结构外膜的主要结构,在维持外膜结构,保证物质运输,作为大肠菌素、噬菌体受体以及参与F因子结合等方面有重要作用<sup>[7]</sup>。另外OMP在细菌致病性和免疫性中的作用也日益受到重视<sup>[8,9]</sup>。本研究在了解Va-OMP主要特性的基础上,对溶藻弧菌外膜蛋白(Va-OMP)在小鼠的免疫原性和免疫保护性进行深入的研究,为寻找针对石斑鱼的溶藻弧菌保护性抗原和制备

OMP 菌苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

Va-1、Va-2、Va-3、Va-4、Va-5、Va-6、Va-7 菌株系从患病鲑点石斑鱼分离, Va-8 菌株、Va-9 菌株、Va-11 菌株、Va-13 菌株分别为西班牙马拉加大学 Morinigo 博士,美国伊利诺伊大学 Weidong Zhou,日本名古屋大学 Michio Homma 和日本东京大学海洋研究所 Kazuhiko Kogure 赠送, Va-10 菌株和 Va-12 菌株分别购于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)和中国医学细菌保藏中心(CMCC)。

### 1.2 小鼠

NIH 纯系, 18~22g, 来源于广东省医学实验动物中心。经饲喂1周无异常后供实验用。

### 1.3 免疫原的制备

溶藻弧菌外膜蛋白 Va-3-OMP 的制备 参照有关外膜蛋白的制备方法<sup>[10]</sup>, 选取 Va-3 菌株制备 Va-3-OMP。超声处理采用超声波破碎机(Fisher Scientific, 550 Sonic Dismembrator)。样品的蛋白浓度用紫外/可见蛋白核酸分光光度(Pharmacia Biotech, Ultrospect 2000, UV/Visible Spectrophotometer)测定。制备的 Va-OMP 进行 SDS-PAGE 电泳以检定制备效果。

Va-3-LPS 的制备 采用改进的酚-水抽提法<sup>[11]</sup>。

Va-3 灭活菌苗 将 Va-OMP 菌株接种 TSA+1% NaCl 培养基, 28℃ 培养。0.3% 甲醛生理盐水洗菌成悬液, 60℃ 水浴灭活, 稀释成  $10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$  备用。

Va-3-OMP<sub>58</sub> 抗原 将制备的 Va-OMP 进行常规 SDS-PAGE 电泳, 切下目的蛋白带用等渗盐水将凝胶匀浆捣碎, 稀释成适当浓度备用。

### 1.4 Va-OMP 在小鼠中诱导的主动免疫保护

主动保护性试验 方法 A: 分别用制备的 Va-3-OMP ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、Va-3-OMP<sub>58</sub> ( $100$

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Va-LPS ( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和灭活的 Va-3 菌 ( $10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )腹腔注射小鼠,两周后加强,对照组注射无菌盐水。末次注射后 10 d 各组用  $50\times\text{LD}_{50}$  Va 菌 ( $\times 10^7\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )腹腔注射进行攻击。

方法 B:于第 1 天、第 5 天分别腹腔注射 0.1 mL Va-3-OMP ( $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Va-3-OMP<sub>58</sub> ( $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) Va-LPS ( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和灭活的 Va-3 菌 ( $10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),对照组注射无菌生理盐水。7d 后用适当剂量活菌 ( $\times 10^7\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )腹腔注射进行攻击。

**免疫保护性测定** 活菌攻击后,对照组和免疫组观察 14 d,每天记录死亡数,计算每组的存活率。

**组织匀浆液中细菌的计数** 在不同间隔时间处死小鼠,取攻击鼠的肝、脾、肾称重,PBS 匀浆,取上清 10 倍系列稀释,然后涂布于琼脂平板上。28 °C 培养,测定菌落形成 (CFU)的数目。

**血清收集** 分别收集对照组和免疫组小鼠的血清,56 °C 灭活 30 min, -20 °C 贮存备用。

### 1.5 被动保护性试验

Va、Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 兔抗血清的制备及鉴定 按照制备多克隆抗体的常规方法获得兔抗血清,贮存于本实验室。抗血清用免疫印迹 (Western blot) 鉴定。常规十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳 (Bio-Rad 微型垂直电泳系统),半干式碳板转移槽 (DYT-III 40C 型,北京六一仪器厂)进行电转移,脱脂奶粉封闭,磷酸吐温缓冲液 (PBST) 洗涤,先后与兔抗 Va-OMP 血清、羊抗兔辣根过氧化物酶 (Immunoglobulin G-horseradish peroxidase, IgG-HRP) 振荡 1h,二氨基联苯胺 (DAB) 显色。

**免疫** 方法 1:分别用灭活的 Va、Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 抗血清尾静脉注射小鼠,每只 0.2 mL,对照组注射无菌盐水。1h 后用  $500\times\text{LD}_{50}$  活菌 ( $\times 10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 进行腹腔注射攻击。方法 2:分别用 Va、Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 组稀释的抗血清腹腔内注射小鼠 (每只 0.5 mL),对照组注射等量生理盐水 24 h 后用活菌 ( $\times 10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 攻击,观察 10 d。

统计不同方法处理的各组的小鼠的死亡情况,计算存活率。

### 1.6 迟发性超敏反应 (delayed-type hypersensitivity, DTH) 试验

分别用制备的 Va-3-OMP ( $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和灭活 Va-3 菌 ( $10^8\ \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )注射小鼠左后足垫 (每只 0.2 mL),右后足垫注射等量体积的含 0.02% Triton X-100 的盐水作对照。分别在 24 h 和 72 h 测量足垫的厚度。

### 1.7 ELISA 检测不同抗原免疫后产生抗体的效价

在免疫后的不同时间分别收集经灭活 Va、Va-OMP、Va-LPS 等抗原免疫的小鼠的血清,按常规间接 ELISA 法测定效价。分别以 Va、Va-OMP、Va-LPS 等为包被抗原,一抗为不同稀释度血清,二抗为羊抗兔 IgG-HRP (博士德,武汉,1:8000),底物为 OPD (邻苯二胺,华美生物工程公司)。用酶标仪 (Bio-Rad, Model 550 Microplate reader) 测定,比较待测孔 OD 值 (P) 与阴性对照孔 OD 值 (N) 的比值,若  $P/N\geq 2.1$  为阳性,  $P/N < 2.1$  为阴性。

## 2 结果

### 2.1 Va-OMP 及抗 Va-OMP 血清制备及鉴定

不同来源 Va (Va-1~Va-9) 的 OMP 图谱显示 (图 1),有多条外膜蛋白带,一般有 5~9 条,分子量多集中在 20~90 kD 之间,其中在 58 kD 有一条较粗大的蛋白带,约占蛋白总量的 55%~70% 以上,为所有 Va 菌株共有。

采用多克隆抗体常规制备方法获得抗 Va-OMP 血清,Western blot 显示抗 Va-OMP 血清主要识别 58 kD 蛋白带 (图 2)。

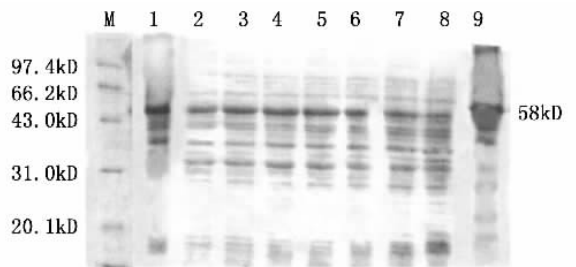


图 1 不同来源 Va 的 OMP 图谱

Fig.1 The spectrum of outer membrane proteins of *V. alginolyticus* from different sources

1-9: Va-1~Va-9; M: 蛋白分子量标准

Lanes 1-9: Va1~Va-9; M: Molecular weight marker

## 2.2 主动保护性试验

Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub>免疫组小鼠免疫后用活菌攻击,免疫保护率为62.5%~86.7%,而Va-LPS组和Va灭活菌苗组的免疫保护率为50%~62.5%,对照组的免疫保护率仅为6.7%。Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub>体现较好免疫效果(表1)。

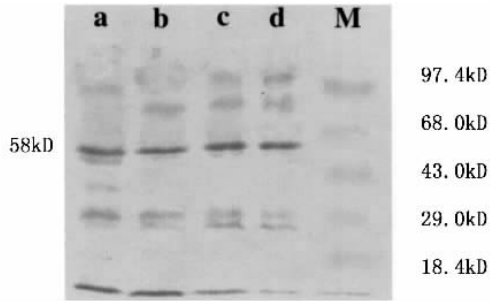


图2 Western-blot 结果

Fig.2 Western-blot of antisera of outer membrane protein of *V. alginolyticus*

a, b: Va 抗血清; c, d: Va-OMP 抗血清; M: 蛋白分子量标准  
M: Molecular weight marker; a, b: antiserum of *V. alginolyticus*;  
c, d: antisera of outer membrane protein of *V. alginolyticus*

## 2.3 被动保护性试验

用不同抗血清免疫小鼠,活菌攻击后,Va-OMP组存活率达到53.3%和66.7%,Va-OMP<sub>58</sub>组次之,存活率为40%和50%,Va灭活菌组的存活率为33.3%和46.7%,对照组为13.3%。与对照组相比较,Va-OMP组差异较显著,保护效果较好(表2)。

## 2.4 组织匀浆液中细菌计数

在活菌攻击后的不同时期,分别处死经不同抗原免疫的小鼠,计数肝、脾、肾脏器菌数。对照组小鼠在1~5d体内菌数剧增,到第9天已先后死亡;OMP组小鼠在1~5d菌数有下降,在5~13d维持在一定水平,直到30d仍有下降。与对照组和其他组比较,OMP组菌数下降较快,体现较好的抗菌机制(图3)。

## 2.5 DTH 试验

免疫10只小鼠,注射OMP的小鼠的足垫较注射前有明显增厚、肿胀,与对照组相比较有显著差异( $P < 0.01$ )(表3、表4)。

表1 Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub>和Va-LPS、inactive Va 对小鼠的主动免疫保护性

Tab.1 Active protective potency of the Va-OMP, Va-OMP<sub>58</sub> and Va-LPS, inactive Va in mice

分组 groups	剂量( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) dose	实验数 mice no.	死亡数 no. of death	死亡率(%) mortality	免疫保护率(%) survival percentage
Va-OMP( method A )	50	15	2	13.3	86.7
Va-OMP( method B )	50	15	4	26.7	73.3
Va-OMP <sub>58</sub> ( method A )	100	8	2	25	75
Va-OMP <sub>58</sub> ( method B )	100	8	3	37.5	62.5
Va-LPS( method A )	10	10	4	40	60
Va-LPS( method B )	10	10	50	50	50
inactive Va( method A )	$10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	15	4	26.7	73.3
inactive Va( method B )	$10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	15	7	46.7	53.3
对照 control	无菌生理盐水 sterilized saline	15	14	93.3	6.7

表2 抗 Va、Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub>血清对小鼠的被动保护性效果

Tab.2 Passive protective potency of anti-Va, anti-Va-OMP and anti-Va-OMP<sub>58</sub> serum in mice

	anti-Va-OMP serum		anti-Va-OMP <sub>58</sub> serum		anti-Va serum		对照 control
	1	2	1	2	1	2	
剂量( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )dose	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	无菌盐水 sterilized saline
实验数 mice no.	15	15	10	10	15	15	15
死亡数 death No.	5	7	5	6	8	10	13
死亡率(%) mortality	33.3	46.7	50	60	53.3	66.7	86.7
存活率(%) survival percentage	66.7	53.3	50	40	46.7	33.3	13.3

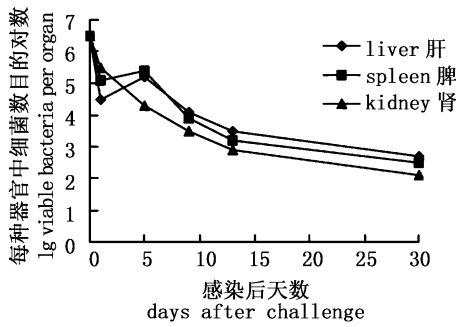


图3 免疫小鼠攻击后 Va 菌在不同脏器(肝、脾、肾)中的分布情况

Fig.3 Growth curve of challenged bacteria in liver, spleen and kidney of immunized mice by Va-OMP

表3 不同免疫组小鼠足垫肿胀试验结果(24h)

Tab.3 Delayed footpad response in mice

分组 group	足垫肿胀增厚值 adding of footpad
Va-OMP	0.84 ± 0.09 (P ≤ 0.01 两组差别非常显著)
inactive Va	0.58 ± 0.11 (P > 0.05 两组差别无显著)
对照 control	0.26 ± 0.1

表4 不同免疫组小鼠足垫肿胀试验结果(72h)

Tab.4 Delayed footpad response in mice

分组 groups	足垫肿胀增厚值 adding of footpad
Va-OMP	0.90 ± 0.12 (P ≤ 0.01 两组差别非常显著)
inactive Va	0.62 ± 0.12 (P ≤ 0.01 两组差别非常显著)
对照 control	0.26 ± 0.1

2.6 ELISA 检测结果

在不同免疫时期分别取血清用间接 ELISA 方法检测特异性抗体(图4)。OMP 组能产生较高效价的特异性抗体,抗体效价不断增加,在第6周达到最高,约 1:1024 以上,第8周开始下降。而 LPS 组和灭活 Va 组次之。

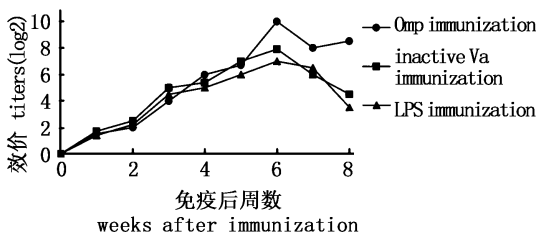


图4 Va-OMP、Va-LPS 和灭活 Va 免疫后抗体检测

Fig.4 Detection of antibody after immunized with Va-OMP, Va-LPS and inactive Va antigen

3 讨论

溶藻弧菌是沿海地区食物中毒和散在性腹泻的重要病原菌,广泛存在于世界各地海水和海产品中,其数量居海洋类弧菌之首。早在 1973 年, Biake 就证实该菌对人类有致病作用,主要是引起肠道外感染。近年来,世界各地均陆续报道从急性胃肠炎患者粪便中检出溶藻弧菌。李文科等报道由溶藻弧菌引起食物中毒,并从分离菌检出 ST 和 LT 肠毒素。同时溶藻弧菌也是许多水产动物的致病菌,特别是海水养殖品种,如中国对虾 (*Penaeus chinensis*)、日本对虾 (*P. japonicus*)、尖吻鲈 (*Lates calcarifer*)、真鲷 (*Pagrosomus major*)、台湾地区的石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*)、赤点石斑鱼 (*E. akaara*)、黑鲷 (*Sparus aurata*)、鲷鱼 (*Mugil cephalus*)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)、双壳贝类等<sup>[12-15]</sup>。

外膜是革兰氏阴性菌特有的结构,位于细菌的表层,具有直接与机体免疫系统接触的机会。纯化的 OMP 有可能作为菌苗来预防相应的细菌感染。多年来,已有多种菌纯化或部分纯化了 OMP,如伤寒沙门氏杆菌、痢疾杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、淋病奈瑟氏菌、绿脓杆菌、志贺氏菌、b 型流感嗜血杆菌、大肠杆菌、霍乱弧菌、奇异变形杆菌<sup>[16-18]</sup>等,并深入探讨了其免疫原性和免疫保护性,结果表明 OMP 菌苗具有显著的免疫保护作用。OMP 菌苗作为一种新型的非细胞型菌苗,具有广阔的前景。

国内有少数学者分离了鳗弧菌、副溶血弧菌和溶藻弧菌的外膜蛋白并研究其特性<sup>[10,19,20]</sup>,但未见关于免疫原性和免疫保护性的详细报道。我们利用初步制备的 Va-OMP 菌苗、Va-OMP<sub>58</sub> 菌苗与 Va 灭活菌苗、Va-LPS 菌苗相比较,发现前两者的保护性效果高于后两者,证明 OMP 具有较强的免疫原性。DTH 试验也证明,OMP 能诱发变态反应,间接证明 OMP 具有较强引起细胞介导免疫(CMI)的能力。因此实验证明,Va-OMP、Va-OMP<sub>58</sub> 是能在小鼠产生体液免疫和细胞介导免疫的保护性抗原。关于 Va-OMP 对于石斑鱼的免疫保护性的试验正在积极进行中。

OMP 免疫时伴随 LPS 抗体同时产生,与其中含微量 LPS 有关。由于 LPS 与 OMP 在细菌细胞壁中紧密结合,用一般提取方法很难完全将其去

除。微量 LPS 与 OMP 牢固结合在一起,与 OMP 的抗原决定簇形成 LPS - OMP 复合物,维持一定抗原天然构型,也可能对 OMP 起免疫佐剂作用<sup>[9]</sup>。LPS 是一种型特异性的保护性抗原,而 OMP 菌苗却可针对所有的菌株,OMP 菌苗具有更大的优越性。

本文初步制备的 Va - OMP、Va - OMP<sub>58</sub>具有较理想的免疫保护性,可作为 OMP 菌苗的候选成分。进一步的研究可利用分子生物学方法,通过遗传工程表达,大量获取 OMP,研制新型口服基因靶向控释疫苗,以深入研究 Va - OMP 菌苗的作用机制、效果和在生产实践中的应用。

#### 参考文献:

- [1] 吴灶和,潘金培. 石斑鱼鱼虱病的研究 V. 盐度对南海鱼虱存活的影响[J]. 热带海洋,1998,17(1):66-70.
- [2] Qin Q W, Lam T J, Sin Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. J Virol Methods,2001,98(1):17-24.
- [3] 李宁求,白俊杰,吴淑勤,等. 斜带石斑鱼 3 种致病性弧菌的分子生物学鉴定[J]. 水产学报,2005,29(3):356-361.
- [4] 何建国,林 鑫,黄志坚. 海水鱼类溶藻弧菌致病性的初步研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版),1998(增刊)53-55.
- [5] 朱传华,何建国,黄志坚. 网箱养殖石斑鱼爆发性溃疡病原菌分离、鉴定及致病性研究[J]. 中山大学学报(自然科学版),2000,39(增刊)278-282.
- [6] 黄志坚,何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性[J]. 中山大学学报(自然科学版),2002,41(5):64-67.
- [7] 徐建国. 分子医学细菌学[M]. 北京 科学出版社 2000.
- [8] Suzuki S, Kuroe K, Yasue K, et al. Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35kD prerin-like protein of *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species[J]. Letter Appl Microbiol,1996,23:257-260.
- [9] 李福胜,赵凤兰,胡 军,等. 鼠伤寒杆菌外膜蛋白免疫原性及免疫保护性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,1993,13(3):156-158.
- [10] 张晓华,Robertson P, Austin B, 等. 弧菌标准菌株外膜蛋白的比较研究[J]. 微生物学报,1997,37(6):449-454.
- [11] 罗 杰,罗海波,陆德源. 现代微生物学实验技术及其应用[M]. 北京:人民卫生出版社,1997.
- [12] 吴后波,潘金培. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学,2001,8(1):89-93.
- [13] Lee K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider[J]. Microb Pathog,1995,19:39-48.
- [14] Austin B, Stobi M, Robertson P A W, et al. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. in a Scottish aquarium[J]. J Fish Dis,1993,16:277-280.
- [15] 林克冰,周 宸,刘家富,等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 台湾海峡,1999,18(3):342-347.
- [16] Colquhoun J D, Sorum H. Outer membrane protein expression during *in vivo* cultivation of *Vibrio salmonicida*[J]. Fish & Shellfish Immun,1998,8:367-377.
- [17] 于国林,戴 翔,仁明德,等. 耶尔森氏菌外膜蛋白-1. 体外条件的观察[J]. 地方病通报,1993,26:6-9.
- [18] Bogwald J, Stensvag K, Hoffman J, et al. Electrophoretic and immunochemical analysis of surface antigens of the fish pathogens *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum*[J]. J Fish Dis,1990,13:293-301.
- [19] 张晓华,徐怀恕. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究[J]. 中国水产科学,1997,4(4):49-53.
- [20] 周 丽,刘洪明,战文斌,等. 鳃弧菌、溶胶藻弧菌外膜蛋白的分离及特性[J]. 中国水产科学,2003,10(1):31-35.