

## 创伤弧菌外膜蛋白免疫刺激复合物对欧洲鳗鲡的免疫保护性分析

田 丁 许斌福 林能峰 龚 晖 林天龙

(福建农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

### OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *VIBRIO VULNIFICUS* INDUCED PROTECTIVE IMMUNITY TO THE EUROPEAN EELS

TIAN Ding, XU Bin-Fu, LIN Neng-Feng, GONG Hui and LIN Tian-Long

(Biotechnology Institute, the Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003 China)

关键词: 创伤弧菌; 外膜蛋白; 欧洲鳗鲡; 免疫刺激复合物; 免疫保护性

**Key words:** *Vibrio vulnificus*; Outer membrane proteins (OMPs); European eels (*Anguilla anguilla*); Immune-stimulating complexes (ISCs); Protective immunity

中图分类号: S943 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0431-05

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是一种革兰氏染色阴性、多形性、运动性、有荚膜的嗜盐性细菌,属于弧菌属第5群,主要生长于海水中、鱼类及贝母类等体内<sup>[1]</sup>。根据寄主范围和生化反应类型的不同,将创伤弧菌分为3个生物型:生物I型(产吡啶)<sup>[2]</sup>、生物II型(不产吡啶)<sup>[3]</sup>以及1999年以色列的研究人员报道的创伤弧菌生物III型。其中创伤弧菌生物I型可经口或伤口感染,引起严重的皮肤溃疡、创伤感染、肠胃炎和原发性败血症等病症,在感染该型菌株的病人中,发病死亡率高达60%以上<sup>[4,5]</sup>;该型菌株也可引起鳗鲡发病<sup>[6,7]</sup>;生物II型是鳗鲡的病原菌,可引起养殖鳗鲡出血性败血病(弧菌病)<sup>[8]</sup>。笔者实验室于2003年7月从福建省长乐市发病欧洲鳗鲡分离到毒力较强的创伤弧菌FJ03-X2<sup>[7]</sup>,并鉴定为生物I型。

目前创伤弧菌给福建的鳗鲡养殖业造成了较大的经济损失,传统的化学药物防治方法带来了一系列不可克服的问题,所以研制高效、低毒疫苗的要求就显得尤为迫切。随着疫苗学的不断发展,亚单位疫苗越来越受到人们的重视,与此同时免疫刺激复合物(Immune stimulating complexes, ISCs)的疫苗学价值亦备受关注。但是对于创伤弧菌外膜蛋白(Outer membrane proteins, OMPs)-ISCs亚单位疫苗研究的报道至今仍然比较少见。革兰氏阴性菌表

面的外膜蛋白与细菌的致病性及免疫保护性关系密切<sup>[9,10]</sup>,在决定宿主免疫反应的特异性上起着重要作用<sup>[11]</sup>。笔者通过此前的研究发现创伤弧菌外膜蛋白具有较强的抗原性,推测是主要的免疫原组分之一<sup>[12]</sup>。本文中,我们制备出了创伤弧菌生物I型外膜蛋白ISCs亚单位疫苗,用来免疫欧洲鳗鲡进行免疫保护和抗体应答水平检测试验,旨在探讨创伤弧菌外膜蛋白ISCs作为疫苗的免疫效果,为有关疫苗研究和应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株与动物

创伤弧菌生物I型菌株为本研究室分离、鉴定、保种<sup>[7]</sup>,来源于欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)。该菌株具溶血活性和酪蛋白酶活性,对欧鳗幼鳗的半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)约为 $7.1 \times 10^3$  CFU/尾,并已利用16S rDNA序列比较分析及创伤弧菌溶血素特异性Nested-PCR进行了联合鉴定。

取自福建长乐鳗鲡养殖场健康欧鳗(规格约为17 g/尾)。试验前停食7d,检查血清抗体水平,并杀灭体外寄生虫,暂养于43 cm × 35 cm × 58 cm的自动恒温循环水族箱中,加水至箱深的3/5左右,放养密度15尾,室温

收稿日期: 2008-12-04; 修订日期: 2009-11-10

基金项目: 国家863资助项目(2006AA100308); 福建省科技重点项目(2008N0023); 福建省基金项目(2008J0057); 农业部公益项目(nyhyzx07-043-15)资助

作者简介: 田丁(1980—),男,安徽六安人;硕士研究生;主要从事发育生物学及鱼类免疫学研究。E-mail: tianding0988@163.com

通讯作者: 林天龙(1955—),男,研究员;主要从事动物免疫学及水产动物保护学研究。E-mail: lint05@163.com

(24℃±1)℃, 水源为经活性炭吸附和曝气处理的全自动循环水, 每隔 2 天给予换水 1/3。训饵正常后进行试验, 免疫一周后适量投喂商用欧鳗饲料。本试验所用鳗鱼单抗由林天龙等制备保存。

1.2 摇床法培养创伤弧菌

**TSA 培养** 在超净工作台内挑取创伤弧菌接种于含 1% NaCl 的 TSA 培养基上划线, 放置在隔水式恒温培养箱 30℃培养过夜。

**摇床培养** 从上述 TSA 培养的细菌中挑取单菌落接种于含 1% NaCl 的 TSB 培养液(200 mL)中, 摇床(28℃、180 r/min)培养 24h, 并作对照。

1.3 创伤弧菌外膜蛋白的提取

按改进的 Sarkosyl 法<sup>[13]</sup>进行提取。菌体于 4℃ 6000 r/min 离心洗涤 3 次, 每次 15min, 沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬, 全菌经超声波破碎 4min (功率 200 W, 工作 5s, 间隔 5s)。将破碎菌于 4℃ 6000 r/min 离心 15min, 取上清于 4℃ 18000 r/min 再离心 60min, 沉淀用 5 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0、含有 2 mmol/L EDTA)缓冲液重悬, 再加入 2 倍体积的 0.5% sarkosyl (十二烷基肌氨酸钠)重悬, 37℃静置 30min 后 4℃ 18000 r/min 离心 30min, 沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬后再 4℃ 18000 r/min 离心 30min, 沉淀用 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 重悬沉淀, 即为收集到的外膜蛋白。以 BSA (华美)标准法绘制标准曲线, Bradford 法测定蛋白浓度, 样品分装于-20℃保存。

1.4 OMP-ISCOMs 的制备与鉴定

参照方勤美等<sup>[14]</sup>方法制备。将 OMP 加入含 2%(质量分数)非离子去污剂 Mega-10 的 PBS 溶液中, 使之 37℃裂解 4h, 按照蛋白的含量添加一定比例的 QuilA 至终浓

度为 0.05% (美国康奈尔大学教授 Ted clark 博士惠赠), 再加入卵磷脂和胆固醇(现配现用)使其终浓度为 125 μg/mL; 冰浴超声波(200 W)共作用 10min, 然后分别装入透析袋中对 10 mmol/L PBS (pH 为 7.4)透析 72h, 每 4h 换液一次。Bradford 法测定蛋白浓度, 即为粗制 OMP-ISCOMs 亚单位疫苗。采用电镜观察法对上述粗制 ISCOMs 进行鉴定。取上述 OMP-ISCOMs 10 μL 滴在铜网上, 2%醋酸铀负染, 温箱烤干后置透射电镜(JEM-120EX)下观察并拍照。

1.5 免疫、采血与攻毒

**免疫** 供试鱼分 3 组: OMP 免疫组、OMP-ISCOMs 免疫组、对照组。OMP 免疫组 10 尾健康欧鳗, OMP-ISCOMs 免疫组和对照组各 28 尾健康欧鳗(其中设采血组)。以 0.85% 灭菌生理盐水将粗制 OMP、OMP-ISCOMs 调整为 200 μg/mL 的悬液。免疫组以 200 μL/尾腹腔注射免疫(40 μg/尾), 对照组每尾腹腔注射 0.85% 灭菌生理盐水 200 μL。

**采血** 免疫后的第 7、14、21、28、35、42 天分别对 OMP-ISCOMs 免疫组及对照组随机各取 3 尾欧鳗, 以一次性注射器尾椎采血, 所采血 37℃放置 1h, 4℃过夜, 10000 r/min 离心 10min, 取上清, 分装后于-40℃冰箱冻存备用。

**攻毒** 免疫后第 28 天攻毒。分 2 个实验组和 1 个对照组, 每组 10 尾健康欧鳗。FJ03-X2 菌株细菌培养和计数后将细菌稀释到浓度为 2.0×10<sup>5</sup> cfu/mL, 每尾腹腔注射菌悬液 0.2 mL 攻毒。一周内观察并统计结果。分组和攻毒情况(表 1)。

依下列公式计算免疫组的免疫保护力。

免疫保护力(Relative percent survival, RPS) = [1 - (受免组死亡率/对照组死亡率)]×100%

表 1 攻毒和采血分组情况表  
Tab. 1 Challenge and collect blood groups

免疫原 Immunogens	攻毒剂量 (cfu/尾) Challenge dosage	攻毒尾数 Number of fish challenged	采血尾数 Number of fish challenged
OMP (2.4 μg/g)	4.0×10 <sup>4</sup>	10	0
OMP-ISCOMs (2.4μg/g)	4.0×10 <sup>4</sup>	10	18
对照 PBS Control	4.0×10 <sup>4</sup>	10	18

1.6 酶联免疫吸附法(ELISA)检测免疫欧洲鳗血清抗体应答水平

采用间接 ELISA 法测定对应免疫欧鳗的血清抗体效价。首先分别以全菌、OMP 包被 96 孔板 4℃过夜。经系列稀释的 7、14、21、28、35、42d 的 OMP-ISCOMs 免疫组欧鳗血清为第一抗体, 第二抗体为鼠抗欧鳗免疫球蛋白单克隆抗体 Mab8H1 与 7E2 腹水抗体<sup>[15]</sup>等比 1:1000 稀释, 第三抗体为 1:5000 稀释的 HRP 酶标羊抗鼠抗体

(Sigma), OPD 显色(Sigma)。酶标仪读数, 设空白和阴性对照, P/N 大于 2 判为有效。

1.7 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析

SDS-PAGE 中, 采用 Mini-Protein cell II 系统(BioRad)进行不连续垂直凝胶电泳, 浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 染色凝胶用低分子量标准蛋白。每孔蛋白上样量约 5 μg。免疫印迹中, 取首次免疫 21d 和 28d 的经 1:800 稀释的欧鳗血清为第一抗体, 第二抗体和第三抗体同 1.6 描述, DAB

显色(Sigma)。具体步骤参考《蛋白质技术手册》<sup>[16]</sup> 进行。

## 2 结 果

### 2.1 ISCOMs 电镜图

待测样品用 2%醋酸铀染色后在电镜下观察到创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs 的直径在 30—40 nm 之间, 呈现较为典型的笼样球状结构(图 1 放大倍数 50000×)。



图 1 创伤弧菌外膜蛋白-ISCOMs 电镜图

Fig. 1 The Vv-OMP-ISCOMs under electron microscope

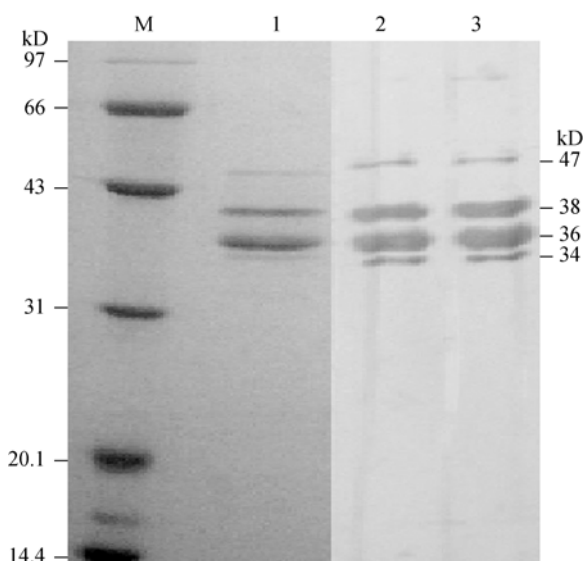


图 2 创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs 的 SDS-PAGE 及其相应 Western-blotting 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blotting patterns of OMP-ISCOMs of *Vibrio Vulnificus*

M. Marker ; 1. 创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs ; 2. 21d 欧鳗血清 ; 3. 28d 欧鳗血清

M. Protein low range Marker ; 1. OMP-ISCOMs of *Vibrio Vulnificus* ; 2. Serum of *Anguilla anguilla* on the 21<sup>st</sup> day ; 3. Serum of *Anguilla anguilla* on the 28<sup>th</sup> day

### 2.2 创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs 的 SDS-PAGE 和 Western-blotting

制备的 OMP-ISCOMs 经 SDS-PAGE 分析(图 2)显示

具有 4 条主要蛋白条带, 他们的相对分子量分别为 47、38、36、34 kD。这与此前分析的创伤弧菌外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱是一致的(另文报道)。在相应的免疫印迹中, 上述 4 条主要 OMP-ISCOMs 蛋白条带与第 21 天和第 28 天所采免疫欧鳗血清形成较强的免疫反应发色带, 说明免疫欧鳗能够针对 OMP-ISCOMs 产生相应抗体。

### 2.3 OMP-ISCOMs 免疫欧洲鳗鲡血清抗体应答规律

ELISA 法测定的免疫组和对照组欧鳗血清抗体(NS-7d、14d、21d、28d、35d、42d)的 P/N>2.0, 且差异显著。免疫欧鳗后, OMP-ISCOMs 免疫组血清抗体水平先呈现上升趋势(第 7 天的效价为 1:100, 第 14 天的效价为 1:3200, 第 21 天的效价为 1:6400), 免疫后第 28 天达到峰值, 此时抗体效价可达 1:12800, 之后开始下降(第 35 天的效价为 1:3200, 第 42 天的效价为 1:1600); 但是在第 42 天仍能检测到相应抗体(图 3)。

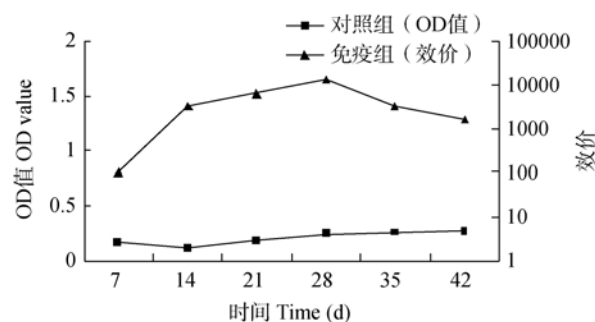


图 3 以 Vv-OMP 包被时血清抗体效价

Fig. 3 The kinetics of antibody production in serum coated with Vv-OMP

从 ELISA 板各孔 OD 值变化来看, OMP-ISCOMs 免疫欧鳗后, 免疫组血清抗体水平先呈现上升趋势, 免疫后第 28 天达到峰值, 相应 OD 值为  $1.098 \pm 0.077$ , 之后开始下降; 但是在第 42 天仍能检测到相应抗体, 相应 OD 值为  $0.583 \pm 0.077$  (图 4)。

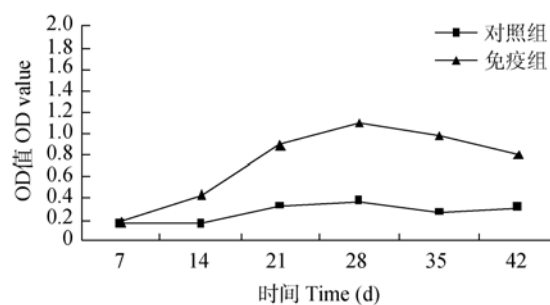


图 4 以 Vv-OMP 包被时血清抗体应答曲线

Fig. 4 The kinetics of antibody production in serum coated with Vv-OMP

通过实验分析笔者认为, OMP-ISCOMs 能够刺激欧鳗产生体液免疫应答, 并且整个应答过程中血清抗体水

平呈现出一定的消长规律。

2.4 免疫保护性试验结果

创伤弧菌 FJ03-X2 菌株的 LD<sub>50</sub> 约为 7.1×10<sup>3</sup> cfu/尾, 本研究再结合预攻毒实验, 确定实际攻毒剂量为 4.0×10<sup>4</sup> cfu/尾。攻毒结果(表 2): 攻毒 168h 后 OMP 组仍有 8 尾

存活, 免疫保护率为 80%; OMP-ISCOMs 组的 10 尾全部存活, 免疫保护率为 100%; 对照组则全部死亡。死亡欧鳗体表发炎、溃烂且伴有出血症, 发病症状较为典型。比较而言, OMP-ISCOMs 免疫组欧鳗对创伤弧菌 FJ03-X2 菌株的抵抗力显著增强, 获得了很好的免疫保护性。

表 2 对照和免疫欧洲鳗对 FJ03-X2 菌株攻击的存活率比较

Tab. 2 Comparison of relative survival percent of control and immunized *Anguilla anguilla* against challenge of *Vibrio Vulnificus* strain

免疫原 Immunogens	攻毒剂量(cfu/尾) Challenge dosage	攻毒尾数 Number of fish chal- lenged	存活率 Survival after 72h (%)	存活率 Survival after 168h (%)	免疫保护力 RPS
OMP	4.0×10 <sup>4</sup>	10	8/10	7/10	70%
OMP-ISCOMs	4.0×10 <sup>4</sup>	10	10/10	10/10	100%
对照 Control	4.0×10 <sup>4</sup>	10	2/10	0/10	0

3 讨论

抗原与 Quil A、胆固醇以及卵磷脂结合形成直径为 30—40 nm, 呈笼格状结构的免疫刺激复合物(ISCOMs)<sup>[17]</sup>。ISCOMs 类似膜表面抗原构造, 这种结构既固化了抗原分子, 同时也较好的模拟了体内识别抗原的微环境, 将可溶性抗原包装成颗粒性抗原, 加强了抗原的免疫原性<sup>[18]</sup>。

从 1984 年 Morein, *et al.*首次将免疫刺激复合物(ISCOMs)技术用于麻疹、副流感病毒-3 型和狂犬病毒膜蛋白亚单位疫苗的制备到现在, ISCOMs 已经被应用于众多疫苗的研制, 并且免疫效果非常理想。近年来 ISCOMs 在水产动物疾病防治研究中得到了充分的重视。方勤美等<sup>[13]</sup>将粗提的嗜水气单胞菌溶血素重组表达产物制成 ISCOMs 对鳗鲡进行注射免疫, 保护率可达 100%。董传甫等<sup>[19]</sup>将嗜水气单胞菌外膜蛋白制成 ISCOMs 免疫鳗鲡, 结果证实免疫效果良好且能诱导宿主产生跨血清型的交叉免疫保护。而董传甫和林天龙等<sup>[20]</sup>分别用创伤弧菌的胞外产物(ECPs)和 ECPs-ISCOM 免疫欧鳗, 攻毒后观察一周, 发现 ECPs 免疫组 72h 内全部死亡, ECPs-ISCOM 免疫组的免疫保护率约为 84%, 表现高度的免疫效力。

本研究制备了创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs, 即 OMP-ISCOMs。通过对欧鳗的免疫保护性试验证实, OMP-ISCOMs (免疫剂量为 40 μg/尾)免疫组的免疫保护率显著高于 OMP (免疫剂量为 40 μg/尾)免疫组, 在初次免疫中取得了很好的免疫保护效果, 表明 OMP-ISCOMs 具有较强的免疫原性。这与 Sjolander A, *et al.*报道嵌入 ISCOMs 中的抗原其免疫原性显著增强<sup>[21]</sup>是基本一致的。ISCOMs 是一种新型抗原呈递系统, 与其他疫苗抗原呈递系统不同之处在于, ISCOMs 能活化免疫系统的所有 3 种抗原特异性正向淋巴细胞: 辅助性 T 细胞(TH)、细胞毒性 T 细胞(CTL)和 B 细胞<sup>[22]</sup>; 因此, ISCOMs 在增强体液

免疫应答的同时诱导细胞免疫应答, 还可通过黏膜途径递呈抗原, 其具有诱导动物机体产生全面免疫应答的能力<sup>[23]</sup>。本试验结果也支持了上述观点。通过对 OMP-ISCOMs 免疫组欧鳗第 7、14、21、28、35、42 天血清抗体效价的比较, 发现 OMP-ISCOMs 免疫组第 7 天的血清效价和对照组第 7 天的效价没有明显差异, 这可能说明欧鳗体液免疫应答相对哺乳类动物要迟缓一些。根据实验结果推测 OMP-ISCOMs 能诱导欧鳗产生较长时间的体液免疫应答, 抗体水平具有明显的消长规律。用第 21 天和第 28 天采集的 OMP-ISCOMs 免疫组欧鳗血清进行免疫印迹证实, OMP-ISCOMs 免疫组欧鳗血清能够和 OMP-ISCOMs 发生清晰的免疫反应, 主要反应条带大致分子量分别为 47、38、36、34 kD。而这 4 种蛋白成分推测是创伤弧菌重要的免疫原组分之一(另文报道)。目前对于欧洲鳗免疫机理的研究还处于起步阶段, 笔者建议可以利用 OMP 较强的免疫原性进一步研究欧鳗的体液和细胞免疫应答类型, 为免疫学方法防治养殖鳗鲡疾病提供必要的理论依据。

参考文献:

[1] Chiang S R, Chuang Y C . *Vibrio vulnificus* infection: clinical manifestations, pathogenesis, and antimicrobial therapy [J] . *Microbiol Immunol Infect*, 2003, **36**(2): 81—88

[2] Linkous D A, Oliver J D . Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* (MiniReview) [J] . *FEMS Microbiol Letters*, 1999, **174**: 207—214

[3] Tison D L, Nishibuchi M . *Vibrio vulnificus* biogroup 2: new biogroup pathogenic for eels [J] . *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**(3): 640—646

[4] Mark S . Strom, Rohinee N . Paranjpye. Epidemiology and Pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J] . *Microbes and Infection*, 2000, **2**: 177—188

- [5] Amaroc, Bosca G. *Vibrio vulnificus* biotype2 pathogenic for eels is also an opportunistic pathogen for humans [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(4): 1454—1457
- [6] Dalsgaard I, Hoi L, *et al*. Indole-positive *Vibrio vulnificus* isolated from disease outbreaks on a Danish eel farm [J]. *Dis Aquat Organ*, 1999, **35**(5): 187—194
- [7] Xu B F, Lin T L, Dong C F, *et al*. Molecular identification of *Virio vulnificus* isolated from the diseased European eels (*Anguilla anguilla*) in mainland China [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2005, **21**(11): 995—997 [许斌福, 林天龙, 董传甫, 等. 鳗鲡创伤弧菌的分子鉴定. 中国人兽共患病杂志, 2005, **21**(11): 995—997]
- [8] Zheng F Y, Shi C B, Pan H J, *et al*. Isolation and identification of pathogen from diseased *Anguilla anguilla* [J]. 2005, **14**(3): 242—247 [郑芳艳, 石存斌, 潘厚军, 等. 鳗鲡溃烂病病原的分离与鉴定. 上海水产大学学报, 2005, **14**(3): 242—247]
- [9] Suzuki S, Kuroe K, Yasue K, *et al*. Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35kD porin-like protein of *Listonella (Vibrio) anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, **23**: 257—260
- [10] Koga T, Kawata T. Isolation and characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Gen Microbiolo*, 1983, **129**: 3185—3196
- [11] Fouz B, Amaro C. Isolation of a new serovar of *Vibrio vulnificus* pathogenic for eels cultured in freshwater eel-farms [J]. *Aquaculture*, 2003, **217**: 677—682
- [12] Tian D, Lin T L, Xu B F, *et al*. Antigenicity and identification of *Vibrio vulnificus* outer membrane proteins [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2008, **23**(4): 337—341 [田丁, 林天龙, 许斌福, 等. 创伤弧菌外膜蛋白的分离及其抗原性分析. 福建农业学报, 2008, **23**(4): 337—341]
- [13] Lutwyche P, Exner M M, Hancock R E W, *et al*. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout [J]. *Infect Immun*, 1995, **63**: 3137—3142
- [14] Fang Q M, Lin T L, Gong H, *et al*. Preparing the ISCOMs of *Aeromonas hydrophila*  $\beta$ -hemolysin expressed in *E. coli* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2004, **19**(4): 238—242 [方勤美, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌  $\beta$ -hemA 重组菌表达产物 ISCOMs 的研制. 福建农业学报, 2004, **19**(4): 238—242]
- [15] Lin T L, Chen Q, Gong H, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibody against *Anguilla anguilla* IgM [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **5**(6): 532—537 [林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白单抗的制备及特性. 水产学报, 2001, **5**(6): 532—537]
- [16] Wang J Z, Fan M. Protein technical manuals [M]. Beijing: Academic Press. 2001 [汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2001]
- [17] Morein B. Immunostimulating complex [J]. *Vet Mic*, 1990, **23**(1-4): 79—80
- [18] Morein B, Bengtsson K L. Functional aspects of iscoms [J]. *Immunol Cell Biol*, 1998, **76**(4): 295—299
- [19] Dong C F, Lin T L, Gong H, *et al*. Major outer membrane protein(MOMP) of *Aeromonas hydrophila* induced protective immunity to European eels (*Anguilla anguilla*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(3): 285—290 [董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验. 水生生物学报, 2005, **29**(3): 285—290]
- [20] Dong C F, Lin T L, Yu F S, *et al*. Analysis of the Pathogenicity and Immunogenicity of Extracellular Products (ECPs) of *Vibrio vulnificus* FJ03-X2 to European eels (*Anguilla anguilla*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, **25**(1): 71—75 [董传甫, 林天龙, 俞伏松, 等. 创伤弧菌 FJ03-X2 胞外产物对欧洲鳗鲡的致病性和免疫原性分析. 华中农业大学学报, 2006, **25**(1): 71—75]
- [21] Sjolander A, Bengtsson K L, Johnsson M, *et al*. Kinetics, localization and isotype profile of antibody responses to immune stimulating complexes (ISCOMs) containing human influenza virus envelope glycoprotein [J]. *Vaccine*, 1989, **7**(2): 164—172
- [22] Sun J H, Yan Y X, Lu C P, *et al*. Studies on the Subunit Vaccine of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1996, **16**(1): 11—15 [孙建和, 严亚贤, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌亚单位疫苗的研制. 中国兽医学报, 1996, **16**(1): 11—15]
- [23] Shen Z H, Qian D, Cao Z, *et al*. Preliminary study on immunization of crucian carp with HEC toxoid from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 1999, **18**(2): 124—128 [沈智华, 钱冬, 曹铮, 等. 嗜水气单胞菌 HEC 毒素对鲫鱼的免疫效果的初步研究. 浙江海洋学院学报, 1999, **18**(2): 124—128]