研究简报

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00431

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 (ISCOMs); 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[1]。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(产吲哚)[2]、生物Ⅱ型(不产吲哚)[3]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[4,5]；该型菌株也可引起鳗鲡发病[6,7]；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)[8]。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[7], 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 complexs, ISCOMs)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)-ISCOMs 亚单位疫苗研究的报道至今仍比较少见。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[9,10], 在决定宿主免疫反应的特异性上起着重要作用[11]。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[12]。本文中, 我们制备出了创伤弧菌生物Ⅰ型外膜蛋白 ISCOMs 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 ISCOMs 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[7], 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_{50})约为 7.1×10^3 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[13]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[14]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 2.0×10^5 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）	4.0×10^4	10	0
OMP-ISCOMs（2.4μg/g）	4.0×10^4	10	18
对照 PBS Control	4.0×10^4	10	18

1.6 酶联免疫吸附法**(ELISA)**检测免疫欧洲鳗鲡血清抗体应答水平

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[15]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》[16] 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

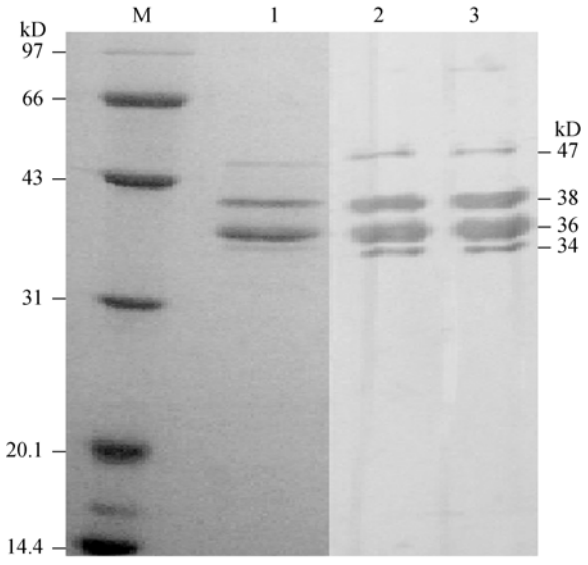


图 2 创伤弧菌外膜蛋白 ISCOMs 的 SDS-PAGE 及其相应 Western-blotting 图谱

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 21st day；3. Serum of *Anguilla anguilla* on the 28th 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)。

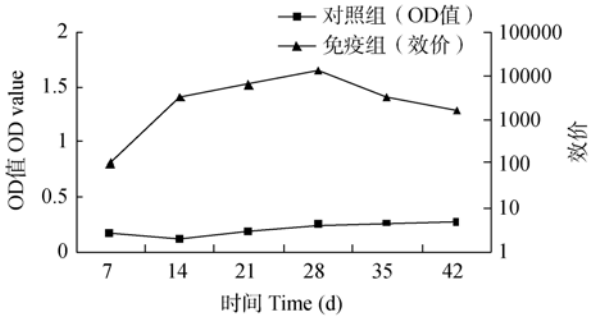


图 3　以 Vv-OMP 包被时血清抗体效价

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±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±0.077 (图 4)。

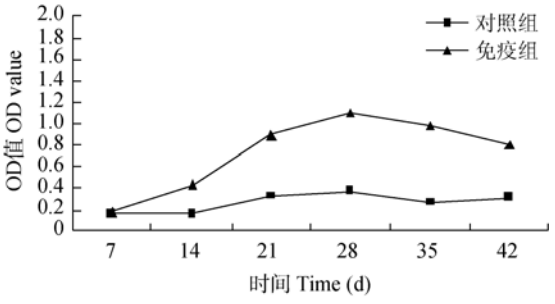


图 4　以 Vv-OMP 包被时血清抗体应答曲线

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_{50} 约为 7.1×10^3 cfu/尾, 本研究再结合预攻毒实验, 确定实际攻毒剂量为 4.0×10^4 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 对照和免疫欧洲鳗鲡对 **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 challenged	存活率 Survival after 72h (%)	存活率 Survival after 168h (%)	免疫保护力 RPS
OMP	4.0×10^4	10	8/10	7/10	70%
OMP-ISCOMs	4.0×10^4	10	10/10	10/10	100%
对照 Control	4.0×10^4	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) [17]。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[18] 。

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[13]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[19]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[20]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[21]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[22]; 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[23]。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)。目前对于欧洲鳗鲡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. Pathogenisis 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 Pathogenisis 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 Miembio1*, 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 paraheamolyticus* [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* β-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 β-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 *Anguillia anguillia* 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 (*Anguillia anguillia*) [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 Immunigenicity of Extracellular Products (ECPs) of *Vibrio vulnificus* FJ03-X2 to European eels (*Anguillia anguillia*) [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, Bengtsseon K L, Johnsson M, *et al*. Kinetice, 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 hydrophilia* [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]