

哈氏弧菌外膜蛋白与溶藻弧菌脂多糖偶联疫苗的效果研究

李华^{1,2}, 石存斌¹, 钱永华², 潘厚军¹, 吴淑勤¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 2. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:采用十二烷基肌氨酸钠法提取哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) SpGY020601 株的外膜蛋白 (OMPC), 采用酚水法提取溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) EpGS021001 株的脂多糖 (LPS)。通过碳化二亚胺 (EDC) 介导的缩合反应, 将哈氏弧菌的 OMPC 与溶藻弧菌的 LPS 偶联。OMPC-LPS 偶联物、未偶联的哈氏弧菌 OMPC、溶藻弧菌 LPS、哈氏弧菌 OMPC 和溶藻弧菌 LPS 的简单混合物以及生理盐水按相同程序免疫卵形鲳鲹 (*Trachinotus cxatus*)。检测血清溶菌酶活性、血清抗体微量凝集反应结果显示, 卵型鲳经 OMPC-LPS 偶联物、OMPC、LPS 以及二者的简单混合物免疫后, 各免疫组间血清溶菌酶活性没有显著差异 ($P > 0.05$), 但均显著高于生理盐水对照组 ($P < 0.05$); OMPC-LPS 偶联物免疫组的血清抗溶藻弧菌 EpGS021001 抗体效价较单纯溶藻弧菌 LPS 免疫组、简单混合物免疫组出现得早, 抗体滴度高; 与此类似, OMPC-LPS 偶联组中抗哈氏弧菌 SpGY020601 的血清抗体效价较单纯哈氏弧菌 OMPC 组、简单混合物出现得早, 抗体滴度高, 且持续时间长; 对 EpGS021001、SpGY020601 的攻击, OMPC-LPS 偶联物免疫组的保护率分别为 85% 和 95%, 高于单纯溶藻弧菌 LPS 免疫组的 70%、单纯哈氏弧菌 OMPC 免疫组的 75%, 也高于简单混合物免疫组的 80% 和 82.5%。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 990-995]

关键词: 溶藻弧菌; 哈氏弧菌; 外膜蛋白; 脂多糖; 偶联疫苗

中图分类号: S943

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)06-0990-06

细菌脂多糖、外膜蛋白亚单位偶联疫苗是 20 世纪 80 年代发展起来的新型疫苗。蛋白偶联疫苗在哺乳动物实验中已取得了较理想的效果, 创伤弧菌荚膜多糖与破伤风类毒素偶联后, 免疫原性高于荚膜多糖与其他非蛋白组份的联合^[1]; 乙型流感嗜血杆菌多糖与蛋白偶联合成的疫苗与其他乙型流感嗜血杆菌疫苗相比其免疫原性更强^[2]; 肺炎链球菌的多糖与外膜蛋白 A 偶联后, 加强了 B 细胞的成熟与记忆, 诱导的抗体滴度高且持久^[3]; 小儿接种的脑膜炎奈瑟菌疫苗、流感嗜血杆菌疫苗等多种人用疫苗均为多糖、蛋白偶联疫苗^[2,4]。在水产动物疫苗研究上, 孙建和等^[5]研制的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 外毒素-脂多糖偶联疫苗免疫鲫后, 对同源菌株的攻击, 其保护率显著高于全菌苗免疫组。尽管国内外对哈氏弧菌和溶藻弧菌的外膜蛋白和脂多糖作为疫苗候选成份进行了研究^[6-7], 并且发现它们均具有较强的免疫原性, 具有疫苗研制的潜力, 但尚未见有研制哈氏弧菌外膜

蛋白-溶藻弧菌脂多糖偶联疫苗的报道。本实验用化学方法交联哈氏弧菌外膜蛋白 (OMPC) 和溶藻弧菌脂多糖 (LPS), 并对该偶联疫苗的免疫效果进行了检测, 以尝试研制新型的哈氏弧菌和溶藻弧菌的亚单位偶联疫苗。

1 材料与方法

1.1 菌株

哈维氏弧菌 SpGY020601 株分离自广东省阳江市某海水养殖场患溃疡病的红鳍笛鲷 (*Lutjanus erythropterus*); 溶藻弧菌 EpGS021001 株分离自广东省深圳盐田实验基地养殖的患溃疡病的斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*), 均由本实验室分离、鉴定和保存^[8-9]。

1.2 实验动物

卵形鲳, 体质量为 42~50 g, 购自广东省大亚湾水产试验中心, 在充气的微流水养殖桶中正常饲养 2 周, 确认健康后用于实验。实验期间海水 pH 保持

收稿日期: 2006-12-06; 修订日期: 2007-04-12.

基金项目: 国家 863 计划“海水养殖鱼类重要病原菌高效疫苗研制” (2006AA100308); 广东省科技计划“海水养殖鱼类重大疾病疫苗及快速诊断” (2004A20401001)。

作者简介: 李华 (1980-), 女, 硕士研究生, 从事分子病原与免疫学研究。E-mail: lihuaannie@126.com

通讯作者: 吴淑勤, Tel: 020-80616813; E-mail: wushuqin001@21cn.com

在 7.9~8.2 之间, 盐度 26~32, 水温 27~32 ℃。

1.3 实验方法

1.3.1 外膜蛋白复合物 (OMPC) 的提取 参照 Peng 等^[10]的方法进行。培养的细菌经 Tris-HCl 洗涤后, 用超声破碎缓冲液重悬, 超声波破碎, 6 000 g, 4 ℃ 离心 30 min 除去未破碎菌体; 将上清液 4 ℃、10 000 g 离心 40 min 后, 其沉淀用 2 倍体积的 2% (W/V) 十二烷基肌氨酸钠处理 20 min, 然后 4 ℃、10 000 g 离心 40 min; 所得外膜蛋白复合物沉淀经冷冻干燥后, 冻存于 -20 ℃ 备用。

1.3.2 脂多糖 (LPS) 的提取及去毒性 参照 Westphal 等的酚水法^[11]进行。细菌用甲醛灭活, 4 ℃、6 000 g 离心取沉淀, 加 68 ℃ 预热双蒸水, 使细菌的浓度达到 10^9 个/mL, 然后加入等体积 68 ℃ 预热的苯酚, 在通风橱内剧烈摇动 10 min, 放入冰水浴迅速冷却至 4 ℃, 然后 4 ℃、10 000 g 离心取上清液; 对沉淀的处理重复上述操作, 最后将所有上清液合并后 4 ℃、10 000 g 离心, 所得上清液即为含 LPS 的溶液; 将上清液移入透析袋在 4 ℃ 用双蒸水透析后, 测定多糖含量后, 冷冻干燥并冻存于 -20 ℃ 备用。

1.3.3 蛋白及多糖含量的测定 采用 Bradford 法^[12]测定 OMPC 含量, 先用 BSA 制作标准曲线, 然后用待测蛋白的 OD₅₉₅ 值, 在标准曲线上找出对应的蛋白浓度。

参照 Dubois 等^[13]的苯酚-硫酸法定量 LPS, 用分析纯葡萄糖制作标准曲线, 根据所测多糖的 OD₄₉₀ 值, 在标准曲线上找出相应的多糖含量。

1.3.4 OMPC 与 LPS 的偶联 参照 Cryz 等^[14]的方法, 采用 EDC 法进行偶联。将 112 mg LPS 加入 10 mL 双蒸水中, 在此 LPS 溶液中加入 390 mg 固体 NaIO₄, 反应 2 min, 氧化反应由 224 μL 乙醇胺终止, 所得溶液用 0.15 mol/L PBS 在 4 ℃ 透析; 390 mg EDC 溶入 5 mL 双蒸水中, 然后加入 90 mg OMPC, 溶液用 HCl 调 pH 为 5.4, 22 ℃ 摇动 2 h; 然后将上述所有 LPS 与含 EDC 的全部 OMPC 混匀, 在 22 ℃ 孵育 1 h, 上述溶液对 0.15 mol/L PBS 在 4 ℃ 透析过夜; 透析后的溶液经浓缩后 4 ℃、8 000 g 离心 30 min, 所得上清即为粗制偶联物。

1.3.5 OMPC-LPS 偶联物的鉴定和纯化 OMPC-LPS 偶联物的定性检测参照孙建和^[15]的方法, 采用双抗体夹心 ELISA 法。兔抗溶藻弧菌 EpGS021001 菌体血清, 以及鼠抗哈氏弧菌 SpGY020601 OMPC

血清按常规方法制备。双抗体夹心 ELISA 程序为: 用兔抗 EpGS021001 菌体血清包被酶标板过夜, 洗涤; 封闭液 37 ℃、1 h 封闭酶标板, 洗涤; 加待鉴定的粗制偶联物和简单混合物, 37 ℃ 孵育 2 h, 洗涤; 加鼠抗哈氏弧菌 SpGY020601 OMPC 血清, 37 ℃ 孵育 2 h, 洗涤; 最后加羊抗鼠辣根过氧化物酶酶标抗体, TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)-过氧化氢尿素显色, 显色反应由 2 mol/L H₂SO₄ 终止, 并测定 OD₄₅₀ 值。

OMPC-LPS 偶联物的纯化采用 Sephacryl S-300 层析, 方法为: 粗制偶联产物经 0.22 μm 过滤器过滤, 将 10 mL 过滤后的产物用柱体积为 120 mL 的 Sephacryl S-300 柱层析, 以生理盐水平衡柱子至紫外吸收基本稳定, 上样, 并以生理盐水洗脱, 流速控制在 1.8 mL/min, 监控 A₂₆₀ 值, 收集相应组分后浓缩备用。

1.3.6 亚单位疫苗的安全性实验 溶藻弧菌的 LPS、哈氏弧菌的 OMPC、二者的简单混合物、以及经纯化和浓缩的偶联物均与葡聚糖 (DEAE) 按 50 μL/100 μg 混合。使 LPS 终浓度为 10 mg/mL, OMPC 终浓度为 0.25 mg/mL、混合物各组分浓度同上、偶联物以 OMPC 计 0.25 mg/mL。各疫苗经腹腔注射卵形鲳鲹各 5 尾, 注射剂量为 0.5 mL/尾, 放于体积为 500 L 的塑料圆桶中饲养, 观察 1 周。

1.3.7 采血与攻毒 卵形鲳鲹随机分成 5 组: 溶藻弧菌 LPS 组、哈氏弧菌 OMPC 组、OMPC + LPS 简单混合物组、偶联疫苗组、生理盐水对照组, 各组设 2 个平行, 每组 85 尾。每种疫苗按安全性实验中的浓度各注射 0.1 mL/尾, 初免后连续 7 天采血, 以后每隔 7 天采血一次。免疫 7 周后腹腔注射攻毒, 溶藻弧菌 LPS 组以溶藻弧菌 EpGS021001 株攻毒, 哈氏弧菌 OMPC 组以哈氏弧菌 SpGY020601 株攻毒, 简单混合物组、偶联疫苗组以及生理盐水对照组的卵型鲳均一分为二, 一半以溶藻弧菌 EpGS021001 攻毒, 一半以哈氏弧菌 SpGY020601 攻毒。注射攻毒时, 溶藻弧菌 EpGS021001 注射剂量为 5.6×10^6 CFU/g, 哈氏弧菌 SpGY020601 注射剂量为 3.8×10^5 CFU/g。记录结果, 按以下公式计算相对保护力。

$$\text{相对保护率 (RPS)} = [1 - (\text{受免鱼死亡率} / \text{对照鱼死亡率})] \times 100\%$$

1.3.8 血清中溶菌酶含量及血清凝集效价的测定

溶菌酶含量测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒, 操作按试剂盒说明书进行。溶菌酶含量 (Lc) 的计算方法为:

$$Lc(\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{测定管透光度} - \text{空白管透光度}}{\text{标准管透光度} - \text{空白管透光度}} \times \text{标准管浓度} \times \text{样本稀释倍数}$$

抗体凝集效价用 96 孔板全菌微量凝集试验法检测, 抗原为福尔马林灭活的 EpGS021001 与 Sp-GY020601 全菌, 浓度均为 10^8 CFU/mL。连续检测 4 周, 攻毒前检测 1 次。

2 结果

2.1 蛋白及多糖含量

根据 OMPC 的 OD_{595} 值、LPS 的 OD_{490} 值, 分别根据各自的标准曲线 (图 1、图 2) 计算相对应的含量。注射时, OMPC 和 LPS 的含量分别调整到 0.25 mg/mL、10 mg/mL, 偶联物中 OMPC 的含量依据非偶联组分中 OMPC 的量计算而得。

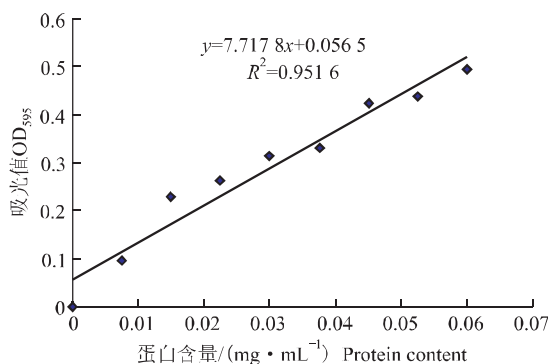


图1 牛血清白蛋白 OD_{595} 标准曲线
Fig.1 Standard curve of BSA OD_{595}

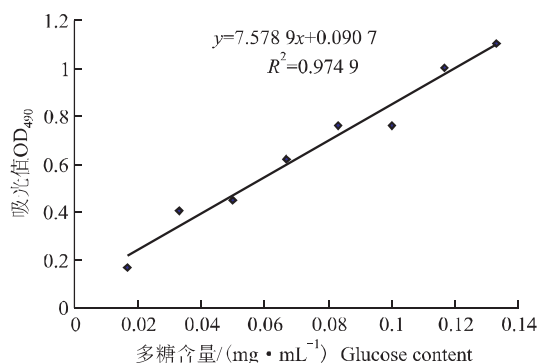


图2 葡萄糖 OD_{490} 标准曲线
Fig.2 Standard curve of glucose OD_{490}

2.2 哈氏弧菌 OMPC 与溶藻弧菌 LPS 偶联物的鉴定与纯化

双抗体夹心 ELISA 结果显示, 随抗原含量的增

加, 偶联物 OD_{450} 值增高; 而简单混合物即使提高抗原含量, OD_{450} 值的变化也不大 (图 3)。

LPS 和 OMPC 的偶联物经 Sephacryl S-300 纯化, 收集洗脱体积 36~81 mL (时间为 20~40 min) 处的峰, 即为 LPS 与 OMPC 的偶联物 (图 4)。

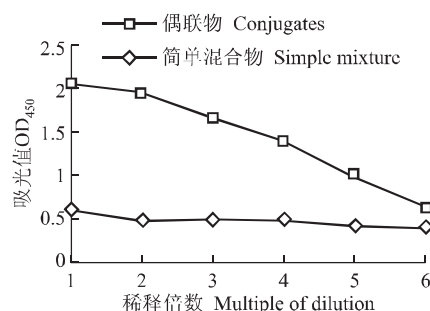


图3 双夹心 ELISA 检测偶联物
Fig.3 Detecting of conjugates by double sandwich ELISA

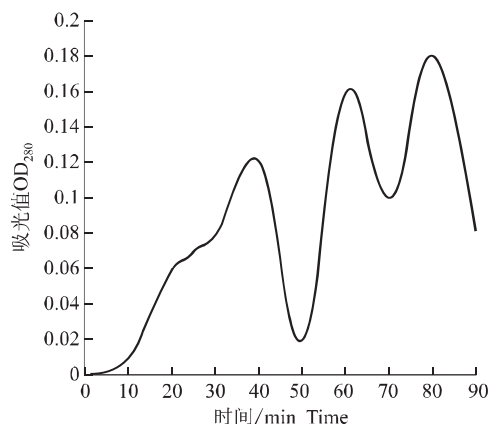


图4 偶联物的 Sephacryl S-300 层析图
Fig.4 Sephacryl S-300 elution profile of conjugates

2.3 亚单位疫苗的安全性

经 1 周时间的饲养观察, 除注射初期出现食欲减退外, 所有注射疫苗和生理盐水的卵形鲳, 皆健活。

2.4 血清中溶菌酶含量测定

注射疫苗后, 卵形鲳的血清溶菌酶含量明显升高, LPS、OMPC、简单混合疫苗和偶联疫苗组均在第 2d 活性达到最高值。各免疫组血清中溶菌酶含量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但各免疫组之间血清中的溶菌酶含量差异不显著 ($P > 0.05$) (图 5)。

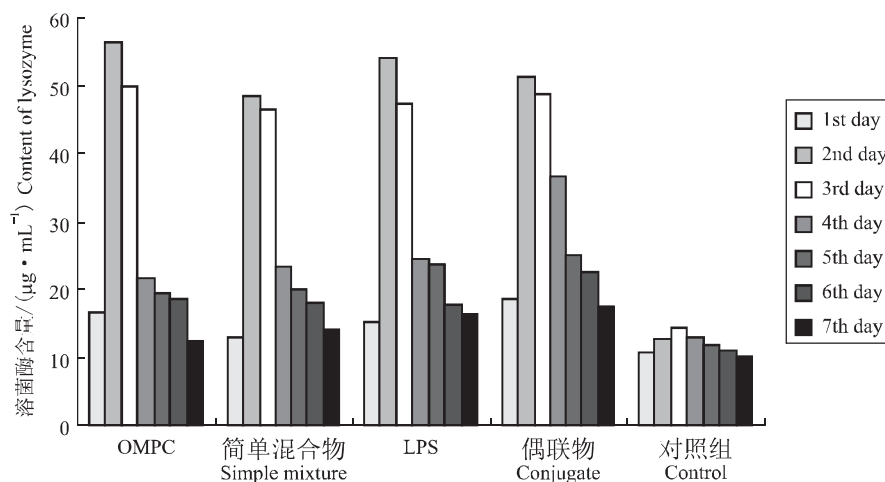


图5 血清中溶菌酶的含量

Fig.5 Content of lysozyme in serum

2.5 血清中抗体凝集效价测定

免疫后第1周, LPS组, 简单混合组, 偶联物组均可检测到抗 EpGS021001 的抗体。LPS组在第4周抗体效价达到最高 (2^8); 简单混合组在第2周抗体效价达到 $2^{6.5}$, 持续1周后开始缓慢下降; 偶联组在第2周达到最高效价 2^8 并能维持2周, 然后开始下降 (图6), 到第7周效价 ($2^{2.5}$) 却低于 LPS 组 (2^3)。

同样, OMPC组、简单混合组、偶联疫苗组在免

疫后第1周就可以检测到抗 SpGY020601 的抗体。OMPC组在第3周抗体效价达到最高 ($2^{5.5}$), 简单混合组在第4周效价达到最高 ($2^{5.5}$), 偶联组在第3周效价达到最高 (2^9), 偶联组抗体效价的升高速度高于简单混合组以及 OMPC 组, 简单混合组第1周的抗体效价高于 OMPC 组, 但后来几周的增长速度和 OMPC 组相当 (图7), 偶联组的效价即使在第7周仍然最高 ($2^{4.5}$)。

生理盐水对照组始终未检测到凝集抗体。

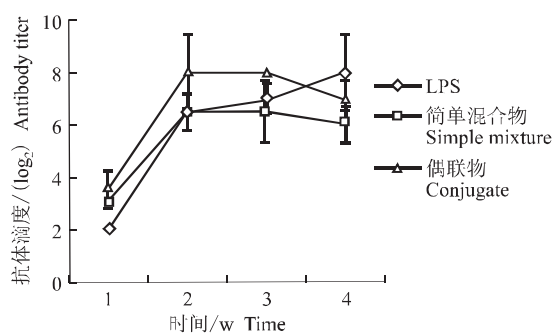


图6 血清对 EpGS021001 的凝集效价

Fig.6 Anti-EpGS021001 antibody titer in serum

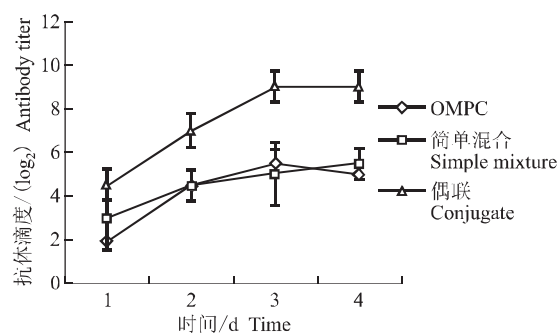


图7 血清对 SpGY020601 的凝集效价

Fig.7 Anti- SpGY020601 antibody titer in serum

2.6 相对保护率的测定

免疫后7周, 卵形鲳鲹对两株菌的免疫保护效果见表1、表2。对溶藻弧菌 EpGS021001 株的攻击, LPS 免疫组、简单混合物免疫组、偶联物免疫组

的相对保护率分别为 70%、80%、85%。对哈氏弧菌 SpGY020601 株的攻击, OMPC 免疫组、简单混合物免疫组、偶联物免疫组的相对保护率分别为 75%、82.5%、95%。

表 1 各组疫苗对溶藻弧菌 *EpGS021001* 株攻击的保护效果Tab.1 The protective effect of different vaccines on *Trachinotus cvatus* challenged with *EpGS021001*

组别 Group	攻击鱼数 /尾 <i>n</i>	死亡鱼数 /尾 Dead fish nos.	存活鱼数 /尾 Survived nos.	保护率 /% Protective rate
LPS 组 LPS group	40	12	28	70
简单混合组 Simple mixture group	40	8	32	80
偶联组 Conjugate group	40	6	34	85
对照组 Control group	40	40	0	0

表 2 各组疫苗对哈氏弧菌 *SpGY020601* 株攻击的保护效果Tab.2 The protective effect of different vaccines on *Trachinotus cvatus* challenged with *SpGY020601*

组别 Group	攻击鱼数 /尾 <i>n</i>	死亡鱼数 /尾 Dead fish nos.	健活鱼数 /尾 Surviving fish nos.	保护率 /% Protective rate
OMPC 组 OMPC group	40	10	30	75
简单混合组 Simple mixture group	40	7	33	82.5
偶联组 Conjugate group	40	2	38	95
对照组 Control group	40	40	0	0

3 讨论

本实验中溶藻弧菌脂多糖与哈氏弧菌外膜蛋白复合物偶联组中血清对 *EpGS021001* 的凝集效价较 LPS 免疫组、简单混合免疫组出现的稍早。在攻毒时效价低于 LPS 免疫组,但保护率却高于单一 LPS 免疫组以及简单混合物免疫组,可能是因为血清中的抗体效价与免疫保护力并不一定成正比关系^[16-17]。偶联物免疫组血清对 *SpGY020601* 的凝集效价较 OMPC 免疫组、简单混合物免疫组出现得早,抗体滴度高,持续时间长,可能是由于偶联后 OMPC 的免疫原性被显著增强了。

溶菌酶作为鱼类的非特异性免疫物质之一,主要在肝脏内合成,分布于体液和体表黏液中,在鱼体防御病原入侵上起着重要作用^[18]。溶菌酶含量的增多,可以增加溶菌酶融解细菌的能力。在本实验中,注射偶联苗和注射各单组分以及简单混合物后,各组之间血清中溶菌酶活性差异不显著 ($P > 0.05$),但均显著高于生理盐水对照组血清中的溶菌酶活性 ($P < 0.05$),且各组的溶菌酶含量都在第二天达到了峰值;可能是由于各个组中的抗原都能很好的刺激肝脏合成溶菌酶。

单一的多糖、蛋白亚单位疫苗,一般只对同源菌株产生免疫保护,对其他菌株不具有或具有较弱的保护力。两种细菌的亚单位成份偶联后,同时具有了对这两种细菌较强的免疫保护力。多糖和蛋白偶联后,使多糖由胸腺非依赖性转变为胸腺依赖性;而

且由于偶联后蛋白被显著增大,免疫原性显著增强,所以多糖和蛋白偶联疫苗的效果高于各单一组分。本实验将溶藻弧菌脂多糖与哈氏弧菌外膜蛋白偶联后,同时具有了对溶藻弧菌和哈氏弧菌的保护力。LPS-OMPC 偶联物对溶藻弧菌 *EpGS021001* 和哈氏弧菌 *SpGY020601* 的攻击,保护率均高于单一 LPS 组、单一 OMPC 组和简单混合组,这说明此种偶联物具有开发成疫苗的潜力。如何降低亚单位偶联疫苗的生产成本,使之能在养殖生产中规模化应用,是今后研究的重要内容。

参考文献:

- [1] Devi S J, Hayat U, Frasch C E, et al. Capsular Polysaccharide-Protein Conjugate Vaccines of CarboType 1 *Vibrio vulnificus*: Construction, Immunogenicity, and Protective Efficacy in a Murine Model[J]. *Infect Immun*, 1995, 8: 2 906-2 911.
- [2] Granoff D M, Holmes S J. Comparative immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugated vaccines [J]. *Vaccine*, 1991, 9 Suppl: S30-S34.
- [3] Libon C, Haeuw J F. Streptococcus pneumoniae polysaccharides conjugated to the outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* elicit protective antibodies [J]. *Vaccine*, 2002, 20: 2 174-2 180.
- [4] Shrimpton A, Duddridge M, Heitbrock L Z, et al. Vaccination with polysaccharide-conjugate-vaccines in adult patients with specific antibody deficiency [J]. *Vaccine*, 2006, 24 (17): 3 574-3 580.
- [5] 孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 嗜水气单胞菌亚单位疫苗的研制 [J]. *中国兽医学报*, 1996, 16 (1): 11-15.
- [6] 覃映雪, 王军, 王世峰, 等. 哈维氏弧菌 TS-628 菌株抗原性研究 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2006, 53 (3): 393-396.

- [7] 间纪常, 叶剑敏, 吴灶和. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响[J]. 水生生物学报, 2004, 28 (1): 103–105.
- [8] 石存斌, 胡学锋, 李宇求, 等. 哈维氏弧菌 SpGY020601 株的鉴定和生物学特性分析[J]. 水产学报, 2004, 28 (增刊): 117–122.
- [9] 胡学峰, 石存斌, 潘厚军, 等. 海水养殖斜带石斑鱼溃疡病病原菌(溶藻弧菌)的初步研究[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35 (2): 232–236.
- [10] Peng X X, Tai X. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* by proteomic methodologies [J]. Vaccine, 2004, 22: 2 750–2 756.
- [11] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further applications of the procedure [M]//Methods in Carbohydrate Chemistry, New York: Academic Press, 1965: 83–96.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] Dubois M, Gillex K A. Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances [J]. Anal Chem, 1956, 28 (2): 350–356.
- [14] Cryz S J, Que J O, Cross A S, et al. Synthesis and characterization of a polyvalent *Escherichia coli* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine [J]. Vaccine 1995, 13 (5): 449–453.
- [15] 孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 嗜水气单胞菌亚单位疫苗的研制[J]. 中国兽医学报, 1996, 16 (1): 11–15.
- [16] Esteve J, Leio Z J, Toranzo A E. Pole of serum antibodies in protection of vaccinated turbot (*Scophthalmus maximus*) against vibriosis [J]. Aquaculture, 1994, 123 (3/4): 197–204.
- [17] Fournier B V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (2): 187–202.
- [18] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 725–743.

Effect of a conjugate vaccine made from outer membrane protein complex of *Vibrio harveyi* and lipopolysaccharide of *Vibrio alginolyticus*

LI Hua^{1,2}, SHI Cun-bin¹, QIAN Yong-hua², PAN Hou-jun¹, WU Shu-qin¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* and *V. harveyi*, the potentially pathogenic bacteria in southern China, caused tremendous economical loss for marine fish culture. To prevent the disease caused by *V. alginolyticus* and *V. harveyi* at the same time, a conjugate vaccine was developed. Lipopolysaccharide (LPS) was extracted from *V. alginolyticus*, and outer membrane protein complex (OMPC) was extracted from *V. harveyi*. Then LPS was conjugated to OMPC by 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) mediated condensation. During the experimental periods, *Trachinotus cvatus* were immunized with the OMPC-LPS conjugates, unconjugated LPS, unconjugated OMPC, simple mixture of LPS and OMPC, and physiological salt solution (control) in the same procedure respectively. The results showed that there were no significant differences in lysozyme activity detected among the four vaccine groups ($P > 0.05$), but remarkable differences were observed between the vaccine groups and control group ($P < 0.05$). Compared with the anti-EpGS021001 antibodies, it appeared earlier and its titer higher in OMPC-LPS conjugates group than in unconjugated LPS and the simple mixture groups ($P < 0.05$). Also, the anti-SpGY020601 antibodies in OMPC-LPS conjugates group appeared earlier with higher antibodies titers and lasted longer than those in unconjugated OMPC and the simple mixture groups ($P < 0.05$). In addition, protective effects of OMPC-LPS conjugates, unconjugated LPS, unconjugated OMPC, and simple mixture groups were evaluated. After challenged with EpGS021001 and SpGY020601, the RPS of OMPC-LPS conjugates group was 85% and 95% respectively, which was significantly higher than the groups of unconjugated LPS (70%) and unconjugated OMPC (75%), so did higher than that of the simple mixture groups (80% and 82.5%). [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 990–995]

Key words: *Vibrio alginolyticus*; *Vibrio harveyi*; lipopolysaccharide; outer membrane protein complex; conjugated vaccine

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com