

牙鲆秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白及其抗原性分析

程顺峰^{1,2}, 邓灯¹, 张毅¹, 姜有声³

(1. 青岛农业大学 动物科技学院, 山东 青岛 266109; 2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 3. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 采用十二烷基肌氨酸钠(Sarkosyl) 和苯甲基磺酰氟(PMSF)2 种方法提取秦皇岛弧菌 HQ010712-1 (*Vibrio qinhuangdaora* sp.nov.)外膜蛋白, 结果显示 Sarkosyl 法提取效果较好, 且所提取的主要外膜蛋白分子量为 102 kD、45 kD、39 kD、36 kD、30 kD、28 kD、24 kD、22 kD; 为比较该菌株与弧菌属其他细菌外膜蛋白组分及抗原性异同, 以鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为对照, 电泳图谱显示 4 种弧菌外膜蛋白的分子量主要集中在 22~48 kD 之间; 利用抗秦皇岛弧菌 HQ010712-1 血清的免疫印迹表明菌株 HQ010712-1 外膜蛋白中分子量为 45 kD、36 kD 的蛋白条带呈现阳性反应, 其他 3 种弧菌外膜蛋白中均有与该抗血清反应的条带, 且分子量为 36 kD 的反应带为菌株 HQ010712-1、副溶血弧菌、溶藻胶弧菌共有。本研究旨在为进一步筛选和研究致病性弧菌的共同保护性抗原提供参考。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1272-1277]

关键词: 秦皇岛弧菌; 外膜蛋白; 抗原性

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)06-1272-06

秦皇岛弧菌(*Vibrio qinhuangdaora* sp.nov.)是国内新发现的一种鱼类病原弧菌, 能引起牙鲆的败血症感染, 具有强致病性和高致死性^[1-3]。外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)是革兰氏阴性细菌细胞壁中所特有的结构, 在病原性弧菌致病过程中发挥着极为重要的作用, 且具有良好的免疫原性和免疫保护性, 是制备亚单位疫苗的良好候选材料^[4-6]。目前, 国内外关于致病菌外膜蛋白的特性有较多研究和探讨^[6-10], 但对于秦皇岛弧菌外膜蛋白构成及抗原性分析未见报道。本课题以由患败血症牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)分离的, 经鉴定为弧菌属一个新菌种, 且经中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)复核鉴定与分类定名的秦皇岛弧菌菌株 HQ010712-1 为实验材料^[1-3], 研究了其外膜

蛋白的组成及抗原性, 同时比较了该菌与水产养殖中常见的 3 种弧菌, 即鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在外膜蛋白构成及免疫学特性等方面的异同, 旨在发现菌株 HQ010712-1 与弧菌属其他细菌共有的外膜蛋白, 为进一步筛选和研究致病性弧菌的共同保护性抗原提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

秦皇岛弧菌菌株 HQ010712-1 由河北科技师范学院动物科学系提供^[1-3]。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻胶弧菌(*Vibrio alginolyticus*)由中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室获得。

收稿日期: 2009-12-15; 修订日期: 2010-02-27.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901106); 山东省自然科学基金项目(Y2007D31, ZR2009DM036); 江苏省海洋生物技术重点建设实验室研究基金资助项目(2009HS11); 青岛农业大学高层次人才科研基金资助项目。

作者简介: 程顺峰(1978-), 男, 副教授, 博士, 主要从事水产动物病害及免疫学研究. E-mail: chengshunfeng@163.com

纯系新西兰大白兔由青岛药检所购得。弗氏完全佐剂及不完全佐剂、碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG、氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸(BCIP)均购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 兔抗秦皇岛弧菌血清的制备

(1)菌悬液的制备 菌株 HQ010712-1 接种于普通营养肉汤培养基(200 mL/瓶)中, 28 °C 培养 18 h, 加入福尔马林溶液 0.5 mL(0.5%)于 37 °C 灭活 24 h, 涂布平板无活菌, 3 000 g 离心 15 min 弃上清液, 沉淀经 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)离心洗涤 3 次, 等体积 PBS 重悬, 用 McFarland 比浊法定细菌浓度为 9×10^8 CFU/mL。

(2)抗血清制备及纯化 制备的菌悬液 4 °C 保存, 新西兰兔具体免疫程序及免疫剂量均参照张伟妮等^[10]的方法进行, 免疫完成后从新西兰兔心脏一次性采血, 室温倾斜放置 1 h, 尔后 4 °C 过夜; 次日 4 °C, 340 g 离心 15 min 得抗血清。采用辛酸-硫酸铵法从获得的血清中纯化 IgG, 纯化后的抗体-20 °C 保存备用。

1.2.2 外膜蛋白的提取 细菌外膜蛋白提取分别按改进的 Sarkosyl、PMSF 法进行。

(1) Sarkosyl 法 摇瓶培养 24 h 的菌悬液 200 mL 置于离心管中, 4 °C、3 000 g 离心 15 min, 重复 3 次后沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬; 然后超声波破碎 4 min(振幅 39%; 工作 5 s, 间隔 5 s), 破碎菌 4 °C、3 000 g 离心 15 min, 取上清液 4 °C、17 000 g 离心 30 min; 沉淀用 5 mL 20 mmol/L Tris-HCl(含有 2 mmol/L EDTA)缓冲液重悬, 再加入 2 倍体积的 0.5% Sarkosyl 溶液, 37 °C 静置 30 min 后 4 °C、17 000 g 离心 30 min; 沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液重悬, 4 °C、17 000 g 离心 30 min, 10 mmol/L PBS(pH 7.4)重悬沉淀, 即为 OMP 样品, -20 °C 保存备用。

(2) PMSF 法 摇瓶培养 24 h 的菌悬液 200 mL 置于离心管中, 4 °C、3 000 g 离心 15 min, 重复 3 次, 前 2 次沉淀用 10 mmol/L PBS(pH 7.4)重悬, 最后 1 次沉淀用 10 mL 含有 10 mmol/L EDTA、2 mmol/L PMSF 的 PBS 重悬, 45 °C 静置 30 min, 尔

后超声波破碎 4 min(振幅 39%, 工作 10 s, 间隔 5 s), 破碎后菌液 4 °C、16 000 g 离心 30 min, 收集上清液, 即为样品, -20 °C 保存。

1.2.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 凝胶中丙烯酰胺浓度: 分离胶 10% (V/V), 浓缩胶 4.75 % (V/V)。样品与电泳样品缓冲液(0.5 mol/L Tris-HCl, pH 6.8; 1 % SDS; 1 % 巯基乙醇; 10 % 甘油; 0.02 % 溴酚蓝)等体积混匀, 煮沸 5 min, 冷却后加样。第 1 次 SDS-PAGE 样品为: Marker(B.B.I.)、菌株 HQ010712-1 全菌、菌株 HQ010712-1 破碎菌、Sarkosyl 法提取菌株 HQ010712-1 OMP、PMSF 法提取菌株 HQ010712-1 OMP。第 2 次 SDS-PAGE 样品为: Marker(B.B.I.)、菌株 HQ010712-1 OMP(Sarkosyl 法提取)、溶藻弧菌 OMP、副溶血弧菌 OMP、鳗弧菌 OMP。采用 Tris 甘氨酸(Gly)电泳缓冲液(0.025 mol/L Tris-Base; 0.25 mol/L 甘氨酸; 0.1% SDS; pH 8.3), 4

电泳。浓缩胶部分恒定电流为 30 mA, 分离胶部分恒定电流为 60 mA。电泳结束后, 采用考马斯亮蓝 R250 染色, 扫描凝胶, Gel-Pro Analyzer 软件分析各蛋白分子量。

1.2.4 外膜蛋白抗原性的免疫印迹分析 电泳结束后, 凝胶置于电泳转移槽中, 加入转移缓冲液(0.025 mol/L Tris; 0.192 5 mol/L Gly; 20% 甲醇; pH 8.3), 稳流 200 mA, 转移 5 h; 转移后的硝酸纤维素膜(NC 膜)用 5% 牛血清白蛋白(BSA)4 °C 封闭过夜; PBST(含有 0.05% Tween20 的 PBS)洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入第一抗体(处理后的兔抗菌株 HQ010712-1 血清), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 以正常兔血清代替第一抗体, 作为阴性对照; 加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(1:30 000, Sigma), 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后加入新鲜配置的 NBT/BCIP 发色液, 室温发色。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 结果

菌株 HQ010712-1 全菌、破碎菌及 Sarkosyl 法、PMSF 法提取的外膜蛋白电泳图谱显示(图 1),

全菌、破碎菌蛋白条带密集, 分子量范围主要集中在 112~35 kD; Sarkosyl 法提取的外膜蛋白共有 8 条清晰可辨的蛋白带, 其分子量分别为 102 kD、45 kD、39 kD、36 kD、30 kD、28 kD、24 kD、22 kD; PMSF 法提取的外膜蛋白条带较多, 且较密集, 其中染色较深的蛋白条带分子量为 116 kD、68 kD、65 kD、45 kD、41 kD、37 kD、36 kD、24 kD。Sarkosyl 法及 PMSF 法方法所提取的外膜蛋白在全菌及破碎菌中均能找到与其对应的蛋白条带。

4 株弧菌外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱显示(图 2), 菌株 HQ010712-1 外膜蛋白与溶藻胶弧菌、副溶血弧菌、鳗弧菌 3 种弧菌外膜蛋白在具体构成上存在较大差异, 但 4 种弧菌外膜蛋白的分子量范围主要集中在 22 ~ 48 kD 之间。

2.2 Western-blotting 图谱

纯化的兔抗菌株 HQ010712-1 全菌血清与菌株 HQ010712-1 全菌、破碎菌及 Sarkosyl 法提取外膜蛋白的 Western-blotting 结果显示(图 3), 全菌

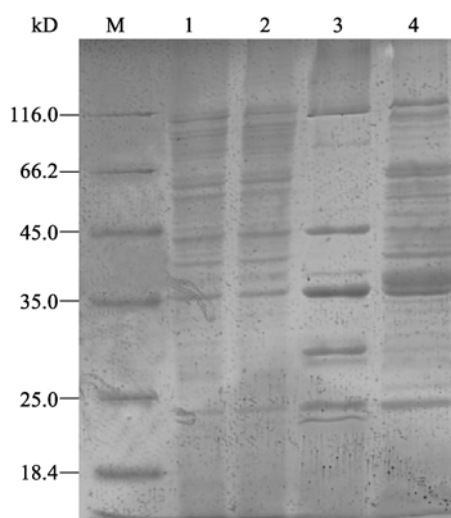


图 1 菌株 HQ010712-1 全菌、破碎菌、外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

M: 蛋白质分子量标准; 1: 全菌; 2: 破碎菌; 3: Sarkosyl 提取外膜蛋白; 4: PMSF 法提取外膜蛋白。

Fig.1 SDS-PAGE of unbroken, broken and OMPs of *Vibrio qinhuangdaora*

M: Molecular weight protein marker; 1: Unbroken *Vibrio qinhuangdaora*; 2: Broken *Vibrio qinhuangdaora*; 3: OMPs obtained by Sarkosyl method; 4: OMPs obtained by PMSF method.

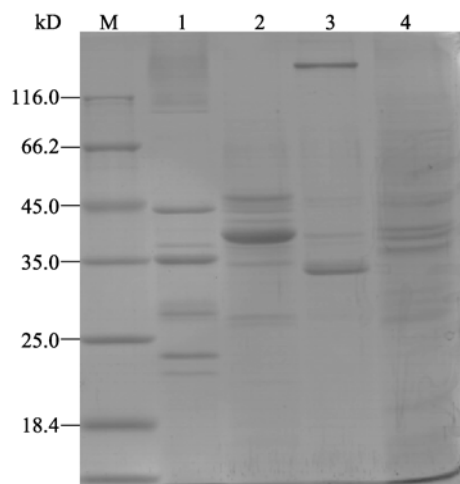


图 2 4 株弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

M: 蛋白质分子量标准; 1: 菌株 HQ010712-1; 2: 溶藻胶弧菌; 3: 副溶血弧菌; 4: 鳗弧菌。

Fig. 2 SDS-PAGE of OMPs of four strains of *Vibrio*
M: Molecular weight protein marker; 1: HQ010712-1; 2: *V. alginolyticus*; 3: *V. parahaemolyticus*; 4: *V. anguillarum*.

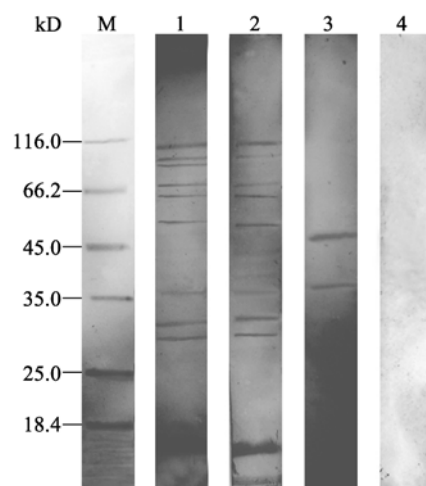


图 3 菌株 HQ010712-1 全菌、破碎菌、外膜蛋白的 Western-blotting 图谱

M: 蛋白质分子量标准; 1: 全菌; 2: 破碎菌; 3: 外膜蛋白; 4: 阴性对照。

Fig. 3 Western-blotting of unbroken, broken and OMPs of HQ010712-1

M: Molecular weight protein marker; 1: Unbroken; 2: Broken; 3: OMP; 4: Negative Control.

和破碎菌的免疫反应发色带较多, Sarkosyl 提取的外膜蛋白有 2 条蛋白带发生反应, 分子量为 45 kD、36 kD。

兔抗菌株 HQ010712-1 血清与鳗弧菌 OMP、

副溶血弧菌 OMP、溶藻弧菌 OMP 免疫印迹结果显示(图 4), 抗血清与 3 种弧菌的 OMP 均有不同程度的免疫反应, 与溶藻弧菌外膜蛋白中分子量为 44 kD、42 kD、38 kD、36 kD、35 kD、33 kD 的蛋白条带发生反应; 与副溶血弧菌外膜蛋白中分子量为 36 kD、34 kD 的蛋白条带发生反应; 与鳗弧菌 OMP 中分子量为 104 kD、80 kD、27kD 的蛋白条带发生反应。

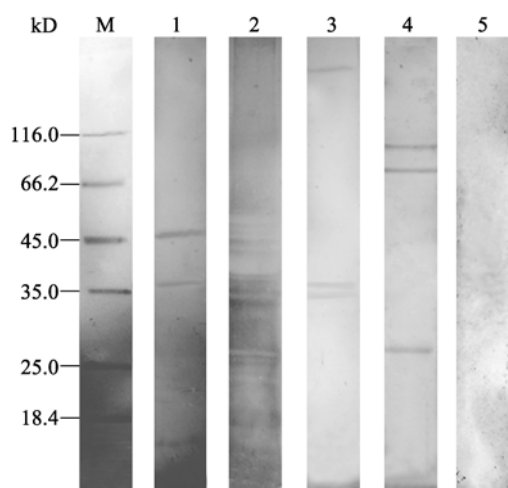


图 4 4 株弧菌外膜蛋白的 Western-blotting 图谱

M: 蛋白质分子量标准; 1: 菌株 HQ010712-1; 2: 溶藻弧菌;
3: 副溶血弧菌; 4: 鳗弧菌; 5: 阴性对照.

Fig. 4 Western-blotting of OMPs of four strains of *Vibrio*
M: Molecular weight protein marker;

1: *V. HQ010712-1*; 2: *V. alginolyticus*; 3: *V. parahaemolyticus*;
4: *V. anguillarum*; 5: Negative Control.

3 讨论

本研究在分析秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白组成及抗原性的基础上, 比较了该菌与鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌等常见弧菌在外膜蛋白成分及免疫特性方面的异同, 结果显示秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白的分子量范围主要集中在 22 ~ 48 kD 之间, 且分子量为 45 kD、36 kD 的蛋白条带与抗血清发生了反应, 其他 3 种弧菌外膜蛋白均有与抗秦皇岛弧菌 HQ010712-1 血清反应的蛋白条带, 且分子量为 36 kD 的反应带为副溶血弧菌、溶藻弧菌、秦皇岛弧菌所共有。

目前, 提取细菌外膜蛋白的方法主要 Sarkosyl

法^[6,10-11]、PMSF 法^[12-13], 周丽等^[11]认为采用 PMSF 法制备的外膜蛋白其蛋白带多且密集, 难以正确区分主要外膜蛋白结构, 而采用 Sarkosyl 法分离的主要外膜蛋白条带清晰。本研究采用 2 种方法提取秦皇岛弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 结果与周丽等描述情况类似, 即 Sarkosyl 法分离制备的主要外膜蛋白条带清晰, PMSF 法分离制备的外膜蛋白的条带多且密, 不易区分。因此, 后续实验中均采用 Sarkosyl 法提取各种弧菌的外膜蛋白。

张伟妮等^[14]利用 SDS-PAGE 方法分析了 14 株水产主要弧菌外膜蛋白的结构后, 认为弧菌属细菌的外膜蛋白分子量范围主要集中于 32 ~ 48 kD 和 66 ~ 106 kD 之间。本实验 SDS-PAGE 图谱显示构成秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白的蛋白条带分子量为 102 kD、45 kD、39 kD、36 kD、30 kD、28 kD、24 kD、22 kD, 外膜蛋白主要条带分子量范围与张伟妮的报道相一致, 但秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白与其他 3 种弧菌外膜蛋白在具体蛋白条带构成上存在差异, 这些有差异的条带可能是该种细菌区别于同属中其他细菌的特异性条带^[15]。此外, 相关研究认为分子量为 36 kD 的外膜蛋白是弧菌属菌株的共有的特异性外膜蛋白组分, 可以作为弧菌属的细菌的标志^[6,10,14,16]。本实验中采用 Sarkosyl 法和 PMSF 法分离的秦皇岛弧菌 HQ010712-1 外膜蛋白中均存在分子量为 36 kD 蛋白条带, 该结果进一步补充了 36 kD 外膜蛋白在弧菌属细菌鉴定中的作用。

董传甫^[16]利用抗副溶血弧菌血清研究副溶血弧菌及溶藻弧菌抗原性时发现, 该血清能与所分离的 10 株副溶血弧菌及 5 株溶藻弧菌的 36 kD 外膜蛋白反应, 但与另外 2 株溶藻弧菌的 36 kD 外膜蛋白无反应; 唐小千等^[6]利用抗鳗弧菌 36 kD 外膜蛋白抗血清研究发现仅有鳗弧菌及哈维氏弧菌的 36 kD 蛋白条带与该抗血清发生阳性反应, 而溶藻弧菌、鱼肠道弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌等 4 种弧菌的 36 kD 外膜蛋白未发生免疫反应, 其认为弧菌属的不同弧菌之间虽然存在一些相同的分子量蛋白, 但并不一定存在免疫交叉特性,

即便几种弧菌之间同分子量的蛋白存在免疫交叉,但发生交叉反应的蛋白也可为不同类型的蛋白。本研究中 Western-blotting 印迹结果显示,抗秦皇岛弧菌 HQ010712-1 血清与菌株 HQ010712-1、副溶血弧菌、溶藻弧菌的 36 kD 外膜蛋白均为阳性反应,而与鳗弧菌外膜蛋白中分子量为 36 kD 蛋白带未发生免疫反应,因此推测构成秦皇岛弧菌 HQ010712-1 与鳗弧菌 36 kD 外膜蛋白的蛋白存在差异,即构成鳗弧菌 36 kD 外膜蛋白中没有与抗秦皇岛弧菌 HQ010712-1 血清结合的抗原决定簇,但秦皇岛弧菌 HQ010712-1 与鳗弧菌及弧菌属其他弧菌在外膜蛋白的组成上究竟有无异同,有待于对相关弧菌外膜蛋白的多肽氨基酸顺序和核酸序列的进一步分析。

参考文献:

- [1] 房海,陈翠珍,张晓君.牙鲆病原秦皇岛弧菌主要生物学形状研究[J].水生生物学报,2005,29(4):366-371.
- [2] 陈翠珍,张晓君,房海,等.牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)秦皇岛弧菌感染症及其病原细菌研究[J].海洋与湖沼,2006,37(1):35-40.
- [3] 张晓君.三种海水养殖鱼类的主要细菌性疾病研究[D].青岛:中国海洋大学,2006:1-90.
- [4] Colquhoun J D, Sorum H. Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of *Vibrio salmonicida* [J]. Fish Shellfish Immun, 1998, 8: 367-377.
- [5] 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.
- [6] 唐小千,战文斌,周丽,等.6种海洋致病性弧菌 36kD 外膜蛋白特性分析[J].中国海洋大学学报,2009,39(2):197-202.
- [7] 高磊,李健,王群,等.鳗弧菌 L-18 株的限铁条件和铁调节外膜蛋白的免疫效果[J].水产学报,2007,31(4):472-477.
- [8] Maji S, Mali P, Joardar S N. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) [J]. Fish Shellfish Immun, 2006, 20(4): 462-473.
- [9] Mao Z J, Yu L, You Z Q, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003 [J]. Fish Shellfish Immun, 2007, 23(3): 567-575.
- [10] 张伟妮,周丽,邢婧,等.大菱鲆致病性溶藻弧菌 SR1 的外膜蛋白及其抗原性分析[J].中国水产科学,2007,14(3):419-424. (12)
- [11] 周丽,刘洪明,战文斌,等.鳗弧菌、溶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.
- [12] 张晓华,徐怀恕.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.
- [13] 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[J].福建农业学报,2008,23(4):337-341.
- [14] 张伟妮,周丽,邢婧,等.水产动物主要弧菌外膜蛋白结构的比较分析[J].海洋水产研究,2008,29(2):23-27.
- [15] 刘洪明.水产动物主要病原细菌免疫特性的比较研究[D].青岛:中国海洋大学,2003.
- [16] 董传甫,林天龙,许斌福,等.电泳和免疫印迹分析副溶血弧菌和溶藻弧菌主要外膜蛋白和多糖抗原[J].中国人兽共患病杂志,2004,20(7):619-623.

Antigenicity of outer membrane proteins of pathogenic *Vibrio qinhuangdaora* isolated from flounder *Paralichthys olivaceus*

CHENG Shunfeng^{1,2}, DENG Deng¹, ZHANG Yi¹, JIANG Yousheng³

(1. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 3. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Vibrio qinhuangdaora* was reported to be a new marine pathogen that had caused vibriosis of fishes. In Qinhuangdao, Hebei Province *Vibrio qinhuangdaora* was one of the causative agents of vibriosis that endangered the aquaculture of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, and no effective therapy was found other than antibiotics. Vaccines have been successfully used to control vibriosis in aquaculture, and information on the outer membrane proteins (OMPs) of several other pathogenic vibrio species have been disclosed. However, little is known about this pathogen. Outer membrane proteins (OMPs) are highly immunogenic bacterial components due to their exposed epitopes on cell surface. Interests have been attracted to understand the biological function of OMPs and their immunogenicity characteristics in immune response. The present study was initiated to analysis the antigenicity of OMPs in *Vibrio qinhuangdaora* strain HQ010712-1 and compared with three universal marine vibriosis species such as *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*, so as to throw some insight to the protective antigens of the bacteria and facilitate vaccine development.

In this experiment, OMPs of four strains of *Vibrio* were obtained by Sarkosyl method combining super centrifugal purification. SDS-PAGE showed that the strain HQ010712-1 had 8 membrane proteins with molecular weights of 102 kD, 45 kD, 39kD, 36 kD, 30 kD, 28 kD, 24 kD and 22 kD. OMPs of the 4 strains of *Vibrio* were analyzed and compared by using SDS-PAGE. The results showed that molecular weights focused on 22–48 kD. After SDS-PAGE, in the Western-blotting with rabbit antiserum against strain HQ010712-1 whole cells, only 2 OMPs of strain HQ010712-1 with molecular weights at 45 kD and 36 kD were detected. It showed that the 2 OMPs had some antigenicity. And the other 3 strains of *Vibrio* all had positive reaction. The band of 36 kD had visible positive reaction in the *Vibrio qinhuangdaora*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1272–1277]

Key words: *Vibrio qinhuangdaora*; outer membrane protein; antigenicity

Corresponding author: CHENG Shunfeng. E-mail: chengshunfeng@163.com