

大菱鲆致病性溶藻弧菌 SR1 的外膜蛋白及其抗原性分析

张伟妮, 周丽, 邢婧, 战文斌

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:用十二烷基肌氨酸钠(Sarkosyl)抽提结合超速离心的方法提取了一株大菱鲆致病性溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)SR1 和其他 7 株弧菌的外膜蛋白。通过 SDS-PAGE 图谱分析比较了这 8 株弧菌外膜蛋白的组成, 结果表明, 8 株弧菌的外膜蛋白电泳一般可得到 6~12 条条带, 其分子量多集中在 65~106 kD 和 28~48 kD, 其中 36 kD 的蛋白带为 8 株弧菌所共有。用兔抗 SR1 全菌血清进行 Western-blot 印迹显示, 菌株 SR1 的外膜蛋白条带中有 6 条发生了阳性反应, 其分子量分别为 73 kD、48 kD、45 kD、39 kD、36 kD 和 32 kD。而其他 7 株弧菌的外膜蛋白与兔抗 SR1 血清也发生程度不等的阳性反应, 这些阳性反应条带的分子量集中在 65~73 kD、45~48 kD 和 36~41 kD 之间, 其中 36 kD 的外膜蛋白在 8 株弧菌中均出现明显的阳性反应, 说明 36 kD 的外膜蛋白是这 8 株弧菌共有的特异性抗原。[中国水产科学, 2007, 14(3): 419-424]

关键词:溶藻弧菌; 外膜蛋白; 抗原性

中图分类号:S941

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)03-0419-06

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐菌, 其广泛存在于世界各地海水和海产品中, 是海水养殖动物如鱼、虾、贝类等的致病菌^[1], 同时也是引起人食物中毒和急性腹泻的重要病原菌^[2]。研制相关疫苗, 开展免疫防治是预防该类疾病的重要手段。由于溶藻弧菌存在多种血清型, 所以到目前为止, 仍无合适的疫苗能有效地控制其发生与流行。对溶藻弧菌抗原成分的深入了解, 是找出与保护性免疫相关的抗原的基础, 对于制备溶藻弧菌工程疫苗具有重要的意义。

革兰氏阴性细菌的外膜是细胞壁的主要结构, 在细菌与宿主的相互关系中发挥了重要的作用^[3]。外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)具有良好的免疫原性, 很容易被宿主的免疫防御体系识别为异物。近年的研究也证实了病原细菌外膜蛋白在作为保护性抗原方面的作用^[4-8], 目前, 外膜蛋白作为病原细菌疫苗制备的重要材料, 在迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌中已做了深入的研究^[4,9], 也有关于弧菌外膜蛋白的研究报道^[2,10-11]。本研究以 1 株已鉴定为大菱鲆腹水症病原的溶藻弧菌(*V. algi-*

nolyticus)SR1 为研究材料, 用十二烷基肌氨酸钠(Sarkosyl)抽提结合超速离心的方法分离提取了该致病性溶藻弧菌的外膜蛋白, 通过 SDS-PAGE 分析其外膜蛋白成分组成, 并通过 Western-blot 确定外膜蛋白的抗原性。同时, 将菌株 SR1 与 2 株致病性弧菌鱼肠道弧菌(*V. ichthyoenteri*)HQ010223-1、鳎弧菌(*V. anguillarum*)S010610-1 及 5 种弧菌标准菌株的外膜蛋白进行了比较, 探讨了菌株 SR1 与其他弧菌外膜蛋白成分的异同及免疫学特征。本研究旨在发现菌株 SR1 外膜蛋白的抗原特异性及与其他 7 株弧菌的共有的特异性抗原, 为进一步研制开发弧菌外膜蛋白亚单位疫苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用致病性溶藻弧菌 SR1 由本实验室提供^[12]。致病性鱼肠道弧菌(*V. ichthyoenteri*)HQ010223-1 和鳎弧菌(*V. anguillarum*)S010610-1 由河北科技师范学院动物科学系提供^[13]。弧菌标准菌株 458、283、295、72 和 310, 由中国海洋大学联

收稿日期: 2006-09-26; 修订日期: 2006-12-11.

基金项目: 国家自然科学基金(30271016); 山东省教育厅科技计划(032070104); 教育部海水养殖重点实验室开放基金(200212).

作者简介: 张伟妮(1980-), 女, 硕士, 主要从事水产动物病害与免疫学研究. 现工作单位: 福建农林大学动物科学学院. E-mail: weinizhang@gmail.com

通讯作者: 周丽(1963-). Tel: 0532-82031862; E-mail: zhoulili@ouc.edu.cn

联合国教科文组织中国海洋生物工程中心(UNESCO • BAC)提供,来自英国 Heriot-Watt 大学生物学系(表1)。作为阴性对照的大肠杆菌(*Escherichia co-*

li)由中国海洋大学水产病害与免疫实验室提供。纯系新西兰兔由青岛药检所提供。

表1 供试弧菌标准菌株

Tab.1 Standard strains of *Vibrio* for testing

细菌名称 Bacteria	菌号 No.	来源 Origin
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	458	LMG 12094
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	283	LMG 4408T
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	295	LMG 4044T
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	72	LMG 4437
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	310	LMG 13545T

1.2 方法

1.2.1 兔抗 SR1 全菌血清的制备

(1)菌悬液的制备 将菌株 SR1 接种于 2216E 固体培养基,25 ℃富集培养 24 h。用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)洗脱,用 McFarland 比浊法将细菌浓度定为 9×10^8 CFU/mL,0.3% 福尔马林 4 ℃灭活 24 h,涂布平板无活菌。4 ℃ 3 000 g 离心 20 min 去除福尔马林,等体积 10 mmol/L PBS(PH 7.4)重悬。

(2)抗血清的制备 免疫纯系新西兰兔,具体程序如下:基础免疫,菌悬液与弗氏完全佐剂 2:1 混匀,采用皮下 6 点注射方法,每点注射 0.2 mL;2 周后加强免疫,菌悬液与弗氏不完全佐剂 2:1 混匀,注射方法与基础免疫相同;3 周后第 2 次加强免疫,采用耳缘静脉注射的方法,注射菌悬液 0.8 mL,无佐剂;4 周后第 3 次加强免疫,方法同第 2 次加强免疫。第 3 次加强免疫后第 6 天抽血测抗体效价大于 3 200,第 7 天从心脏一次性采血,室温倾斜放置 1 h,转入 4 ℃过夜;次日 4 ℃ 340 g 离心 15 min 得抗血清。

1.2.2 抗血清的纯化及效价测定 采用辛酸-硫酸铵法^[14]从血清中纯化 IgG:抗血清用 4 倍体积乙酸-乙酸钠缓冲液(0.06 mol/L, pH 4.0)稀释,NaOH 调 pH 为 4.5;室温下滴加辛酸(25 mL/L),同时缓慢搅拌,然后 4 ℃,10 000 g 离心 30 min;收集上清,加入 10 倍体积 0.1 mol/L PBS 缓冲液,NaOH 调 pH 为 7.4;计算溶液总体积,加入硫酸铵粉末使终质量浓度达到 313 g/L,同时缓慢搅拌,防止出现沉淀,4 ℃静置过夜;次日 4 ℃,5 000 g 离心 20 min,沉淀用少量透析液(0.01 mol/L Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 0.015 1 mol/L NaCl, pH 7.2)溶解,4

℃透析 12 h 后,5 000 g 离心 20 min,吸出上清,即为纯化的抗体,-80 ℃保存备用。间接 ELISA 方法^[14]测得兔抗 SR1 全菌血清效价为 6 400。

1.2.3 外膜蛋白的提取 外膜蛋白的提取采用改进的 Sarkosyl 法^[8,10],具体程序如下:将菌苔收集至 7 mL 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中,振荡混匀。4 ℃ 3 000 g 离心洗涤 3 次,每次 20 min,沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)重悬至 1×10^9 CFU/mL。全菌经超声波破碎 4 min(振幅 39%;工作 3 s,间隔 3 s)。将破碎菌 3 000 g 离心 10 min,取上清 23 000 g 离心 30 min,沉淀用 400 μL 15 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6,含 2.25% Sarkosyl)、1.4 mL 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6,含 1.5% Sarkosyl)及 100 μL 重蒸水重悬,32 ℃静置 30 min 后 23 000 g 离心 30 min,沉淀用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)重悬后 23 000 g 离心 30 min,上述各步离心均于 4 ℃下进行,用 10 mmol/L PBS(pH 7.4)重悬沉淀,即为收集到的外膜蛋白。样品于-20 ℃保存。

1.2.4 SDS-PAGE 图谱 采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳。将样品分别与电泳样品缓冲液(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,每孔加 10 μL 样品。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 ℃下电泳。丙烯酰胺浓度:分离胶 10% (V/V),浓缩胶 4.75% (V/V)。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,凝胶经考马斯亮蓝 R250(Sigma)染色后用全自动凝胶成像

系统扫描,Gel-Pro Analyzer 软件分析各分离蛋白的分子量。

1.2.5 Western-blot 印迹 两次 SDS-PAGE 结束后,凝胶均用 Mini-Protean II cell 系统(BioRad)转移至孔径为 0.45 μm 的硝酸纤维素膜上,200 mA 转移 4.5 h。含有 5%脱脂奶粉的 PBS 缓冲液 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜,PBST(含有 0.05% Tween20 的 PBS 缓冲液)洗涤 3 次,每次 5 min。然后将膜浸在用 PBS 稀释 1 000 倍的兔抗 SR1 全菌血清中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。PBST 洗膜 3 次,每次 5 min。于 PBS 稀释 500 倍的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(Sigma)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 min。PBST 洗膜 3 次,每次 5 min。最后将膜于含有 66 μL NBT 贮液(0.5 g NBT 溶于 10 mL 70%二甲基亚砷)、33 μL BCIP 贮液(0.5 g BCIP 溶于 10 mL 100%二甲基亚砷)的 10 mL NBT/BCIP 缓冲液中发色 20~30 min,晾干。

2 结果与分析

2.1 菌株 SR1 外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

菌株 SR1 的全菌、破碎菌和外膜蛋白的 SDS-PAGE 如图 1 所示,菌株 SR1 的全菌、破碎菌的蛋白条带密集,外膜蛋白则条带清晰,共可发现大约 12 条蛋白带,其中主要条带有 9 条,分子量分别为 106 kD、73 kD、66 kD、51 kD、48 kD、45 kD、39 kD、36 kD 和 32 kD,另有一些较为模糊的蛋白带如 92 kD、82 kD、29 kD。

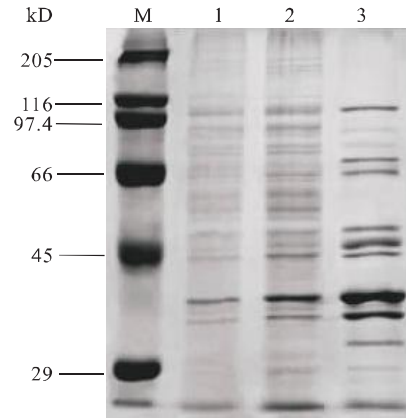


图1 菌株 SR1 的全菌、破碎菌、外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱
M:Marker;1,SR1 全菌;2,SR1 破碎菌;3,SR1 外膜蛋白

Fig. 1 SDS-PAGE of unbroken,broken and OMPs of SR1
M:Marker;1,Unbroken SR1;2,Broken SR1;3,OMPs of SR1

2.2 菌株 SR1 与其他菌株外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱的比较

菌株 SR1、HQ010223-1、S010610-1、458、283、296、72、310 和大肠杆菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 如图 2 所示,菌株 SR1 与其他 7 株弧菌的外膜蛋白表现为构成上的差异性,但一般有 6~12 条蛋白带,且分子量多集中在 65~106 kD 和 28~48 kD 之间。并且明显可以看出 36 kD 的蛋白带为 8 株弧菌所共有,而作为阴性对照的大肠杆菌则没有。

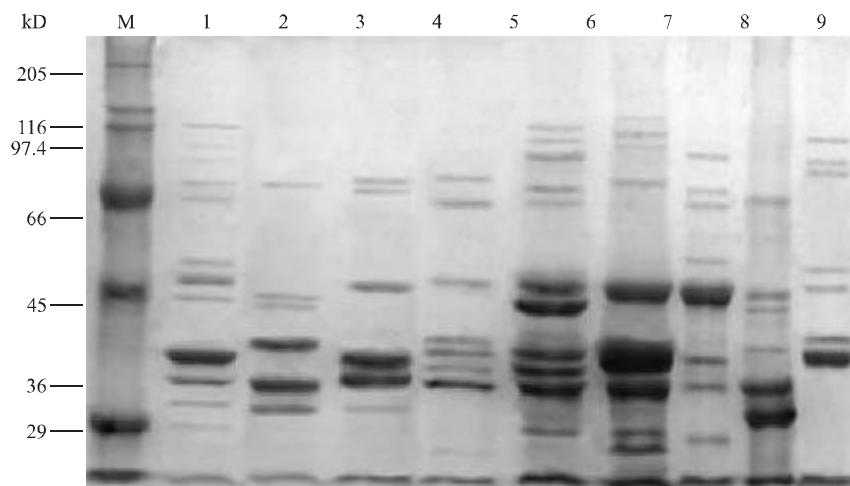


图2 8 株弧菌外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of OMPs of eight strains of *Vibrio*

M:Marker;1,SR1;2,HQ010223-1;3,S010610-1;4,458;5,283;6,295;7,72;8,310;9,*E. coli*

2.3 菌株 SR1 的 Western-blot 印迹

用制备纯化的兔抗 SR1 全菌血清与 SR1 的全菌、破碎菌和外膜蛋白的 Western-blot 印迹如图 3 所示,全菌和破碎菌的免疫反应发色带较多,而外膜蛋白的发色带主要有 6 条,分子量分别为 73 kD、48 kD、45 kD、39 kD、36 kD 和 32 kD。

2.4 菌株 SR1 与其他菌株外膜蛋白的 Western-blot 印迹的比较

图 4 显示了兔抗 SR1 全菌血清与菌株 SR1、HQ010223-1、S010610-1、458、283、295、72、310 和大肠杆菌外膜蛋白的免疫反应结果。兔抗 SR1 全菌血清与 8 株弧菌的外膜蛋白均可发生程度不同的阳性反应,且反应条带的分子量集中在 65~73 kD、45~48 kD 和 36~41 kD。其中,明显可以看出 36 kD 的蛋白反应带为 8 株弧菌所共有。作为对照的大肠杆菌仅有 1 条非常模糊的反应带,分子量大约为 40 kD。

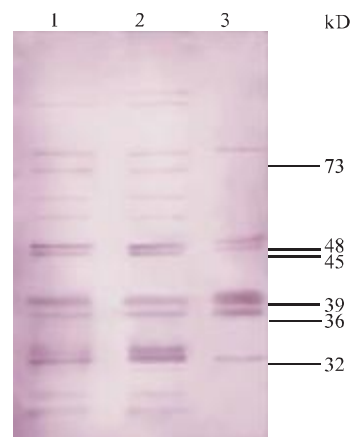


图 3 菌株 SR1 全菌、破碎菌、外膜蛋白的 Western-blot 图谱
1:SR1 全菌;2:SR1 破碎菌;3:SR1 外膜蛋白

Fig. 3 Western-blot of unbroken, broken and OMPs of SR1
1: Unbroken SR1; 2: Broken SR1; 3: OMPs of SR1

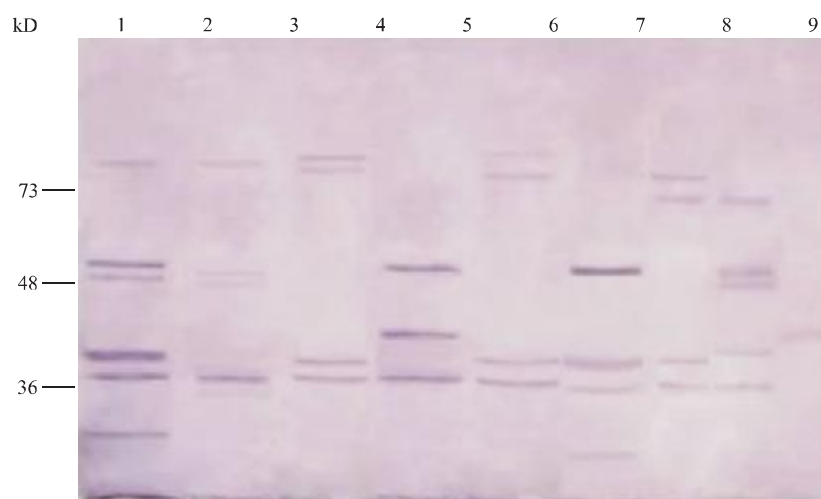


图 4 8 株弧菌外膜蛋白的 Western-blot 图谱

Fig. 4 Western-blot of OMPs of eight strains of *Vibrio*

1:SR1;2:HQ010223-1;3:S010610-1;4:458;5:283;6:295;7:72;8:310;9:*E. coli*

3 讨论

革兰氏阴性细菌的外膜由脂多糖、蛋白质和脂蛋白组成,外膜中含有与重要的细胞功能相关的各种蛋白。据 Barry 等^[15]的报道,提取制备的外膜蛋白中可能存在着细菌外膜内部的一些物质。为此,本实验设计了以溶藻弧菌 SR1 的全菌和破碎菌为对照,以分析比较全菌、破碎菌和外膜蛋白 3 类样品的主要蛋白组成上的差异。SDS-PAGE 图谱显示,全菌和破

碎菌的蛋白条带较多,尤以破碎菌最为密集,原因是细菌经超声波破碎后细胞内部的一些蛋白释放出来,而全菌样品中因为包含了除外膜蛋白以外的其他组分(如鞭毛蛋白等)故蛋白条带也较密集。本实验经 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析,发现提取的外膜蛋白在全菌和破碎菌中均能找到与其对应的蛋白条带,从而确定参与免疫反应的蛋白为外膜成分而非内部物质。由此可见,外膜蛋白比全菌和破碎菌易于分析且结果准确可靠。

本研究 SDS-PAGE 结果表明,此株致病性溶藻弧菌 SR1 的外膜蛋白带主要有 12 条,分子量在 29~106 kD,主要集中在 36~51 kD。与董传甫等^[2]报道的副溶血弧菌和溶藻弧菌的主要外膜蛋白带在 27 kD 至 50 kD 之间的结果不完全一致。同种细菌外膜蛋白的差别可能与细菌的培养条件、外膜蛋白的制备方法、菌株的致病性和血清型不同有关^[16]。

本研究的 Western-blot 印迹分析显示,兔抗 SR1 全菌血清与菌株 SR1 12 条外膜蛋白中只有 73 kD、48 kD、45 kD、39 kD、36 kD 和 32 kD 6 条蛋白可发生程度不等的阳性反应,说明这些外膜蛋白具有一定的抗原性。分析其原因,主要是由于结构上的遮掩和空间阻碍,导致有的外膜蛋白具有较强的抗原性,而有的抗原性较弱或无。

研究表明,细菌的外膜蛋白免疫原性强,是重要的保护性抗原,可对不同血清型菌株的感染产生交叉保护性^[17]。本研究结果发现 8 株弧菌的 36 kD 外膜蛋白均能与兔抗 SR1 菌株的血清发生免疫反应,证明了 36 kD 的外膜蛋白是弧菌共有的特异性抗原。另外本实验中作为阴性对照的大肠杆菌在 40 kD 处有一条微弱的阳性反应带,有可能是该蛋白带与兔抗 SR1 全菌血清发生了非特异性吸附。

董传甫等^[2]发现 36 kD 的外膜蛋白是溶藻弧菌和副溶血弧菌的共同部分,且具有强免疫原性。段翠兰等^[11]报道,35.6 kD 的外膜蛋白是溶藻弧菌 01 株的主要外膜蛋白,具有较强的免疫原性和反应性,为保护性抗原。本研究结果发现 36 kD 的外膜蛋白为溶藻弧菌、鱼肠道弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和创伤弧菌共有的蛋白组分,并且均具有免疫反应性,提示在证明了 36 kD 的外膜蛋白是弧菌共有的特异性抗原的前提下,可以进一步探讨 36 kD 的外膜蛋白是弧菌主要的保护性抗原的可能性,及其作为开发研制弧菌外膜蛋白的亚单位疫苗候选材料的应用价值。

张晓华等^[18]报道,弧菌外膜蛋白在弧菌鉴定上有一定的意义,可以通过观察比较未知菌株与标准菌株外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱的相似性,确定弧菌的种类。本研究发现 36 kD 的外膜蛋白为 8 株弧菌所共有,而作为对照的大肠杆菌则没有该分子量的外膜蛋白,表明该外膜蛋白有可能作为弧菌属的标志,在弧菌鉴定上有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Seltman G, Holst O. The bacterial cell wall[M]. Berlin: Springer, 2002.
- [4] Kawai K, Liu Y, Ohnishi K, et al. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate[J]. Vaccine, 2004, 22, 3: 411—3 418.
- [5] Heckels J E, Fletcher J N, Virji M. The protential protective effect of immunization with outer membrane protein I from *Neisseria gonorrhoeae*[J]. J Gen Microbiol, 1989, 135, 2: 269—2 276.
- [6] Loosmore S M, Yang Y P, Coleman D C, et al. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasion disease[J]. Infect Immun, 1997, 65, 3: 701—3 707.
- [7] Sengupta D K, Sengupta T K, Ghose A C. Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization[J]. Infect Immun, 1992, 60, 4: 848—4 855.
- [8] Lutwyche P, Maurice M E, Robert E W, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout[J]. Infect Immun, 1995, 63, 3: 137—3 142.
- [9] 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[J]. 水生生物学报, 2005, 29(3): 285—290.
- [10] 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.
- [11] 段翠兰,吴灶和,陈辉,等. 溶藻弧菌 01 株外膜蛋白的分离及其抗原性分析[J]. 水产学报, 2004, 28(增刊): 112—116.
- [12] 张伟妮,周丽,邢婧,等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 603—609.
- [13] 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: 50—75.
- [14] 周先碗,胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术[M]. 北京:化学出版社, 2002.
- [15] Barry M P, Trevor J T. Purification and characterization of the cell surface virulent a protein from *Aeromonas salmonicida*[J]. Biochemistry, 1983, 22, 2: 934—2 939.
- [16] Koga T, Kawata T. Isolation and characterization of the outer membrane from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Gen Microbio, 1983, 129, 3: 185—3 196.
- [17] 崔玉宝. 学生及幼儿尘螨过敏情况调查[J]. 中国校医, 2003, 17(1): 13—15.
- [18] 张晓华, Robertson P, Austin B, et al. 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.

Antigenicity of outer membrane proteins of a pathogenic *Vibrio* strain, *Vibrio alginolyticus*

ZHANG Wei-ni, ZHOU Li, XING Jing, ZHAN Wen-bin

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A pathogenic *Vibrio alginolyticus* strain SR1, isolated from ascites of cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) with swollen abdomen, was used to immunize New Zealand rabbit. Strain SR1 could effectively stimulate the rabbit to produce immunity response, and by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) titer of the antiserum was 6 400. Strain SR1 and other seven strains of *Vibrio* were used for preparation of the outer membrane proteins (OMPs) with Sarkosyl method combining super centrifugal purification. SDS-PAGE showed that the pathogenic strain SR1 had 12 membrane proteins, containing 9 major protein bands with molecular weights of 106 kD, 73 kD, 66 kD, 51 kD, 48 kD, 45 kD, 39 kD, 36 kD and 32 kD, and 3 minor protein bands with molecular weights of 92 kD, 82 kD and 29 kD. OMPs of the 8 strains of *Vibrio* were analyzed and compared by using SDS-PAGE. The results showed that there were generally 6–12 OMP bands in each of the 8 strains. Molecular weights focused on 65–105 kD and 28–48 kD, and the protein with molecular weights of 36 kD was common for all the 8 strains.

After SDS-PAGE, in the Western-blot with rabbit antiserum against SR1 whole cells, only 6 OMPs of strain SR1 with molecular weights at 73 kD, 48 kD, 45 kD, 39 kD, 36 kD and 32 kD were detected. It showed that the 6 OMPs had some antigenicity. And the other 7 strains all had positive reaction, with molecular weights of the reaction bands mainly focusing on 73–65 kD, 48–45 kD and 41–36 kD. The band of 36 kD had visible positive reaction in all the 8 strains. This illuminated that the 36 kD OMP was the common special antigen of the 8 *Vibrio* strains. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 419–424]

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

Corresponding author: ZHOU Li. E-mail: zhouli@ouc.edu.cn