

文章编号:1000-0615(2006)01-0009-06

哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达

张崇文^{1,2}, 于 涟², 毛芝娟^{1,2}, 褚武英^{1,2}, 钱荣华^{1,2}

(1. 浙江大学生物医学工程学院, 浙江 杭州 310027;

2. 浙江大学动物预防医学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要:根据哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 的基因序列设计一对引物,应用聚合酶链式反应(PCR)方法,从分离自患病大黄鱼的哈维氏弧菌基因组中扩增获得一段约 800 bp 的序列。将其克隆到 pGEM-Teasy 载体,测序结果证明该序列是哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因。用 PCR 方法去除其信号肽序列,定向克隆到原核表达载体 pGEX-4T-2 构建重组表达质粒 pGEX-4T-OmpK。IPTG 诱导后能够在大肠杆菌 BL21 中高效表达分子量约为 53kD 的 GST-OmpK 融合蛋白。用纯化后的融合蛋白免疫新西兰兔获得了高效价的抗血清。Western blotting 分析表明,它与从哈维氏弧菌中提取的约 27 kD 的外膜蛋白能够发生特异反应,提示外膜蛋白 OmpK 可能是哈维氏弧菌的重要保护性抗原之一。

关键词:哈维氏弧菌;外膜蛋白;OmpK;原核表达

中图分类号:Q78;Q936 **文献标识码:**A

Cloning and expression of OmpK gene from *Vibrio harveyi* in *Pseudosciaena crocea*

ZHANG Chong-wen^{1,2}, YU Lian², MAO Zhi-juan^{1,2}, CHU Wu-ying^{1,2}, QIAN Rong-hua^{1,2}

(1. College of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

2. Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: *Vibrio harveyi* is a causative agent of vibriosis that infects large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) as well as some other marine fish and brings severe loss to their culture. The development of vaccines against vibrio is recognized as a priority to the complement of existing control measures. Recent studies emphasized the role of the outer membrane protein (OMP) of pathogenic bacteria in protective antigenicity. A target of protective immunity, OmpK, is the receptor for KVP40 which is a broad-host-range vibriophage. To investigate the possibility of OmpK as vaccine candidate, primers were designed according to OmpK gene sequence published in GenBank, and a piece of DNA sequence about 800 bp was amplified by PCR from genomic DNA of *V. harveyi* isolated from infected *P. crocea*. The gene was cloned into pGEM-Teasy vector and sequenced. The Blast alignment result indicated that it was indeed the outer membrane protein(OmpK) gene of *V. harveyi*. After its signal peptide sequence was discarded by PCR and the remains was inserted into *E. coli* expression vector pGEX-4T-2, a fusion expression vector pGEX-4T-OmpK was constructed, which can amplify the expression of a 53 kD fusion protein GST-OmpK in *E. coli* BL21 when induced by IPTG. The fusion protein was purified and used as antigen to immunize the New Zealand rabbit, the antiserum with high antibody value was acquired. The Western blotting shows that the anti-recombinant OmpK serum can specifically react to the 27 kD component of natural Omps extracted from *V. harveyi*. This result indicates that the OmpK may be one of the important protective antigens of *V. harveyi*, and may play a role in protecting fish from infection of *V. harveyi*.

收稿日期:2005-04-18

资助项目:浙江省科技计划重点科研社会发展项目(2005C23085)

作者简介:张崇文(1970-),男,甘肃民勤人,博士,从事水产动物病害免疫预防方面的研究。E-mail:chongwenzhang@yahoo.com.cn

通讯作者:于 涟, Tel:0571-86971894; Fax:0571-86971894; E-mail:yulian@zju.edu.cn

Key words: *Vibrio harveyi*; outer membrane protein; Omp K; prokaryotic expression

弧菌是海洋环境中常见的细菌类群之一,其中某些种类会使水产动物致病,给渔业生产造成带来损失,其致病性受宿主的生理状态及水质环境条件等综合因素的影响较大,属条件致病菌。近年来,由于养殖水域生态环境的恶化,弧菌已成为海水养殖动物的主要病原菌之一^[1],其中哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)^[2,3]、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)^[4,5]、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[5]最为多见,常会导致鱼体发生出血性败血症而大批死亡。长期以来一直用于鱼类细菌性疾病防治的抗生素类药物因会导致病菌产生耐药性并在鱼体内残留而限制使用。通过激发动物自身免疫系统而达到防病治病目的的疫苗免疫得到了人们的重视。采用免疫预防控制鱼类细菌性疾病具有其他防治方法所不可比拟的优越性,在控制弧菌、气单胞菌、耶尔森氏菌等革兰氏阴性菌引起的疾病方面取得很大进展^[6]。

外膜蛋白(Outer membrane protein, Omp)是革兰氏阴性菌细胞壁的特有成分。它镶嵌于细菌外膜的中间,约占全部外膜的一半,在维持外膜结构,物质转运方面发挥着重要作用。研究表明,细菌的主要外膜蛋白产量丰富,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^[7]。外膜蛋白的免疫保护力甚至高于灭活全菌疫苗。外膜蛋白在鱼体内也有很高的免疫原性^[8]。研究表明外膜蛋白 Omp K 是一种宽宿主的噬菌体受体^[9],广泛存在于各种弧菌之中,是弧菌细胞表面一种组成性蛋白,具有与外界广泛接触的机会,很有可能是弧菌的表面抗原之一^[10]。本研究通过对其免疫原性的分析,为其作为基因工程亚单位疫苗的候选成分提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

病原株哈维氏弧菌 NB1017 分离自浙江省象山港海水网箱中的患病大黄鱼; *Escherichia coli* DH₅ 和 BL21 (DE3) 菌株由本室保存,克隆载体 pGEM-Teasy Vector 购自 Promega 公司, pGEX-4T-2 Vector 购自 Amersham Biosciences 公司。

1.2 工具酶和试剂

限制性核酸内切酶 *EcoR*、*Sal* (TaKaRa), 异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) (BBI), PCR 纯化试剂盒(北京申能博彩)、DNA 凝胶回收试剂盒(上海生工)、HRP 标记的羊抗兔 IgG(北京鼎国)、Sarcosyl(上海生工),其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 哈维氏弧菌总 DNA 的提取及 Omp K 基因的克隆

取超低温冻存的哈维氏弧菌甘油菌一支,室温融化后接种于 Zobell2216E 培养基,28 ℃ 振荡培养 12 h 以上。取 1.5 mL 菌液于 Ependoff 离心管中,5 000 r·min⁻¹ 离心 1 min,弃上清;灭菌 ddH₂O 悬浮细菌,6 000 r·min⁻¹ 离心 4 min,洗涤两次;加入 35 μL ddH₂O 和 35 μL TZ (4% TritonX-100, 5.0 mg·mL⁻¹ NaN₃,溶于 25 mmol·L⁻¹ pH 8.0 的 Tris-HCl 中), -20 ℃ 放置 30~40 min;沸水浴 10 min;冰浴 10 min;5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集上清。根据 GeneBank 上已登录的哈维氏弧菌外膜蛋白 Omp K 基因序列(登录号: AY332563)设计 1 对引物,上游引物 P₁:

5' - ATGCGTAAATCACTTTTAGCTCTTAG - 3';
下游引物 P₂:

5' - TTAGAACTTGTAAGTTACTGCGATGTAG - 3'。

反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s,共 30 个循环,再 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后割胶回收并用试剂盒纯化,最后以摩尔数比 1:3 (载体/插入片段)的比例克隆入 pGEM-Teasy 载体,蓝白斑筛选阳性克隆,酶切鉴定、PCR 鉴定后阳性克隆送博亚公司测序。

1.4 原核表达载体构建及大肠杆菌诱导表达

为去除 Omp K N 端的信号肽,现重新设计 1 对末端含有 *EcoR* 和 *Sal* 酶切位点的接头引物:

P3: 5' - GGGAAATTCGCTGCTGACTACTCAGACG - 3' (*EcoR*);

P4: 5' - AACGTCGACTTAGAACTTGTAAGTTACTGCG - 3' (*Sal*);

以 Omp K 基因序列为模板,50 μL 反应体系扩增目的片段,试剂盒纯化, *EcoR* 和 *Sal* 双酶切,割胶回收后定向插入经同样内切酶双

酶切的 pGEX-4T-2 质粒载体, 构建重组质粒 pGEX-4T-OmpK, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布 LB (含 Amp 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 平板, 挑取单个菌落, 接种于 5 mL LB (含 Amp 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。碱裂解法抽提质粒, 经酶切、PCR、测序鉴定插入正确后以 1:100 的比例接种于新鲜的 2 \times YT 培养基 (含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.4~1.0, 加 IPTG 诱导表达。

1.5 表达条件的优化

IPTG 设 0.1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 、0.5 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 、1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 3 个浓度, 分别在 42 $^{\circ}\text{C}$ 和 28 $^{\circ}\text{C}$ 两个温度下诱导表达, 确定最佳诱导剂浓度和表达温度, 采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳, 丙烯酰胺浓度: 分离胶 12% (v/v), 浓缩胶 5% (v/v)。上样量每孔 15 μL , 在 150 V 恒压电泳 2 h, 考马斯亮蓝 R250 染色, 冰醋酸脱色。

1.6 表达产物的纯化

先用少许表达菌液超声波破碎后离心, 取上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 电泳, 鉴定表达产物是否形成了包涵体。若是则将所余菌体用缓冲液 A [50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl] 漂洗, 6 000 $\times\text{g}$ 离心 15 min, 重复 1 次。再将漂洗过的菌体细胞悬浮于缓冲液 B [50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 1% NP-40] 中, 超声波破碎, 镜检, 破碎率高于 95%, 1 500 $\times\text{g}$ 离心 30 min, 收集包涵体沉淀。然后悬浮于缓冲液 C [50 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.5% TritonX-100 (v/v), 2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 脲素] 中, 超声波振荡洗涤一次, 1 500 $\times\text{g}$ 离心收集包涵体; 最后溶解在含高浓度脲素的缓冲液 D [8 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 脲素, 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ - 巯基乙醇, 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 及脱氧胆酸钠] 中室温放置 30 min, 1 500 $\times\text{g}$ 离心 30 min, 取上清置于透析袋中, 用 TE 缓冲液 [100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA] 透析, PEG6000 浓缩, Bradford 蛋白法定量, 低温保存备用。

1.7 动物免疫和抗血清的制备

将纯化的融合蛋白皮下多点注射免疫新西兰兔, 每公斤兔注射 250 μg OmpK, 首次免疫用弗氏完全佐剂乳化, 隔两周加强免疫一次, 共两次,

加强免疫均用弗氏不完全佐剂乳化, 末次加强免疫后两周试血, ELISA 检测血清抗体效价, 满意后颈动脉放血, 离心分离血清, 冷冻保存。

1.8 哈维氏弧菌外膜蛋白的提取

参照文献[11]的方法进行, 略有改进。8 000 $\times\text{g}$ 离心菌液, 沉淀用 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液洗涤两次, 再重悬于含有 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 的上述缓冲液中。超声波破碎, 8 000 $\times\text{g}$ 离心取上清, 45 000 $\times\text{g}$ 离心 90 min, 沉淀悬于含 0.5% Sarcosyl 的 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液中, 室温放置过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 然后 45 000 $\times\text{g}$ 离心 90 min, 沉淀即为 OMP, 用适量 ddH₂O 溶解后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.9 免疫印迹

分别取诱导表达后的重组质粒 pGEX-4T-OmpK 和空白质粒 pGEX-4T-2 细菌裂解液以及纯化的 OmpK 蛋白, 抽提的哈维氏弧菌外膜蛋白, SDS-PAGE 电泳后电转印至 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。加入一抗 (兔抗 GST-OmpK 血清, 1:1 000 稀释), TBST [20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] 清洗后加入二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG, 1:1 000 稀释), TBST 清洗, 最后加入显色液 TMB Membrane Substrate (amresco, Ohio USA), 待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

2 结果

2.1 OmpK 基因的克隆

PCR 扩增出一条约 800 bp 的特异条带, 克隆入 pGEM-Teasy 载体, PCR、酶切鉴定正确后测序, 结果用 BLAST 软件搜索比对, 和已登录的哈维氏弧菌外膜蛋白基因 OmpK 同源性高达 99%, 表明克隆到的序列是 OmpK 基因 (图 1)。该基因含有一个 801 bp 的开放读码框 (ORF), 编码 266 个氨基酸, 预测分子量约为 29.78 kD, PI 为 6.764。

2.2 原核表达载体的构建

OmpK 基因经改造去除信号肽序列构建重组质粒, 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切证实插入了一段约 740 bp 的序列, 命名为 pGEX-4T-OmpK (图 2)。

2.3 大肠杆菌的诱导表达

SDS-PAGE 凝胶电泳显示, 诱导重组 pGEX-4T-OmpK 表达的 IPTG 最佳浓度为 0.5

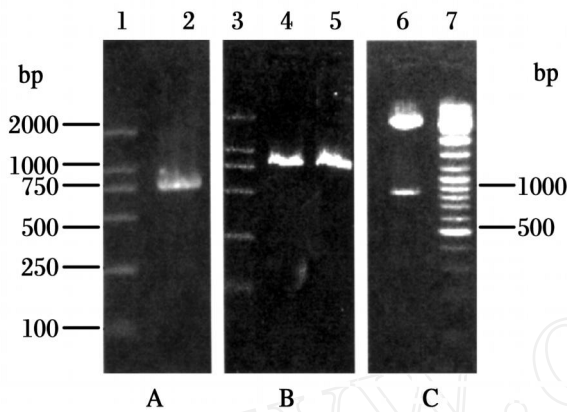


图 1 哈维氏弧菌外膜蛋白基因 Omp K 的克隆(A), PCR(B)及酶切(C)鉴定

Fig.1 Cloning(A) and identification by PCR(B) and restriction enzyme digestion (C) of Omp K gene

from *V. harveyi*

1,3: DL2000 DNA 分子量标记;2,4,5:Omp K PCR 产物;
6: pGEM-Teasy-Omp K 的限制酶切结果;7: GeneRuler™ DNA Ladder mix 分子量标记
1,3:DL2000 Marker;2,4,5:PCR products of Omp K;6:restriction enzyme digestion result of pGEM-Teasy-Omp K;7: GeneRuler™ DNA Ladder mix Marker

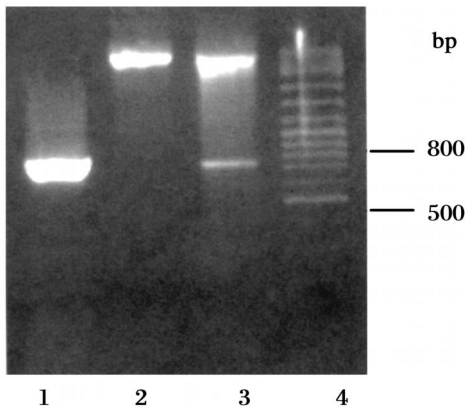


图 2 重组质粒 pGEX-4T-Omp K 的酶切鉴定

Fig.2 The determination of the recombinant vector pGEX-4T-Omp K by enzymerestriction

1: Omp K;2: pGEX-4T-2;3: pGEX-4T-Omp K 经 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切后的结果;4: GeneRuler™ DNA Ladder mix 分子量标记
1: Omp K; 2: pGEX-4T-2; 3: the result of pGEX-4T-Omp K digested by *EcoR* I and *Sal* I; 4: GeneRuler™ DNA Ladder mix Marker

mmol L⁻¹,最佳诱导时间为 5.5 h,在 28 和 42 下都可使 pGEX-4T-Omp K 高效表达(图片未列出)。经 Quantity1 软件分析,在优化的条件下重组蛋白的最高表达量占菌体蛋白的 67.4% 以上(图 3)。从图中可以看出,诱导前非重组质粒

pGEX-4T-2 和重组质粒 pGEX-4T-Omp K 都无显著的外源蛋白表达(图 3 - 1,2);诱导后非重组质粒 pGEX-4T-2 只表达了大小为 26 kD 的半胱氨酸-S-转移酶(GST),而重组质粒 pGEX-4T-Omp K 在 53 kD 左右出现了一条明显的表达蛋白带,与 Omp K(约 27 kD)和 GST(约 26 kD)融合蛋白的大小相一致,而在 26 kD 处几乎没有出现 GST 蛋白带,说明 GST 绝大部分是和 Omp K 融合表达的(图 3 - 3,4)。

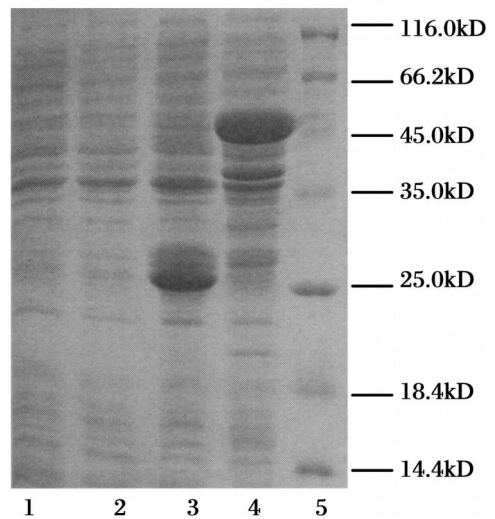


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of expression products

1. pGEX-4T-2(诱导前);2. pGEX-4T-Omp K (诱导前);3. pGEX-4T-2(诱导后);4. pGEX-4T-Omp K(诱导后);5. 蛋白分子量标记。

1. pGEX-4T-2 (before induced); 2. pGEX-4T-Omp K (before induced); 3. pGEX-4T-2 (after induced); 4. pGEX-4T-Omp K (after induced); 5. low molecular protein marker

2.4 ELISA 检测抗体效价

预先取少量诱导表达后的菌液经超声波破碎后再离心,分别用上清和沉淀做 SDS-PAGE,结果表明,目的蛋白绝大部分存在于沉淀中,上清中含量甚微(图片未列出),说明重组蛋白形成了包涵体。经纯化浓缩后用 Bradford 蛋白定量法测定,纯化的融合蛋白浓度达 6.810 μg · μL⁻¹。用纯化的重组蛋白为抗原包被 96 孔板,浓度约每孔 0.68 μg。待测兔抗血清为一抗,第 1 孔稀释 500 倍,以后倍比稀释,免疫前兔血清作阴性对照,HRP 标记的羊抗兔的 IgG 为二抗,邻苯二胺(OPD)溶液显色后酶标仪测定抗体效价在 1 64 000 以上(图 4)。

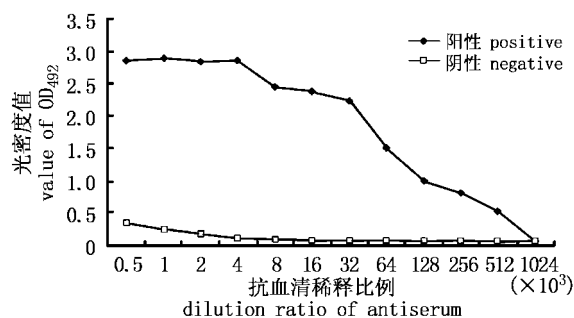


图 4 ELISA 检测抗血清效价

Fig. 4 Determination of anti-serum value by ELISA

2.5 免疫印迹

将诱导后的 pGEX-4T-Omp K 和 pGEX-4T-2 表达菌, 纯化的融合蛋白和抽提的哈维氏弧菌外膜蛋白一起作 SDS-PAGE 电泳, 并电转印至 NC 膜作 Western-blotting。抗血清与 pGEX-4T-Omp K 和纯化的融合蛋白在 53kD 处出现了 1 条明显的免疫条带, 和 pGEX-4T-2 在 26 kD 处的 GST 条带也很明显。多抗和哈维氏弧菌总外膜蛋白在 27 kD 处的免疫沉淀带和预期的 Omp K 大小一致 (图 5)。

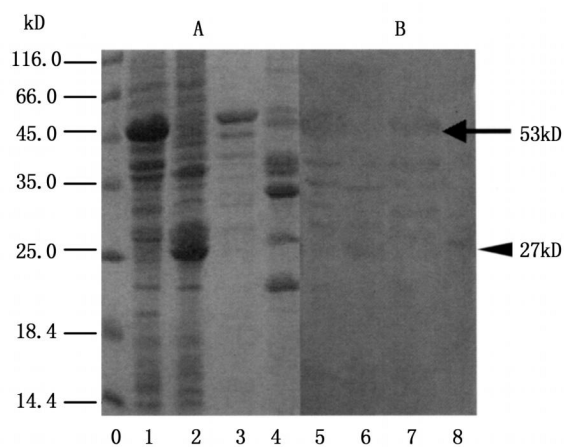


图 5 SDS-PAGE(A) 和免疫印迹 (B)

Fig. 5 SDS-PAGE(A) and Western-blotting (B)

0. 蛋白分子量标记; 1. pGEX-4T-Omp K (诱导后), 对应 5; 2. pGEX-4T-2 (诱导后), 对应 6; 3. 纯化后的 Omp K, 对应 7; 4. 从 *Vibrio harveyi* 提取的 Omp, 对应 8
0. Protein marker; 1. pGEX-4T-Omp K (after induced), corresponding to 5; 2. pGEX-4T-2 (after induced), corresponding to 6; 3. Purified Omp K, corresponding to 7; 4. Omp extracted from *V. harveyi*, corresponding to 8

3 讨论

目前以弧菌的脂多糖作为主要的保护性抗原在疫苗的制备和生产上已经得到了公认, 对于血清型相对单一的细菌来说, 选择特异性良好, 免疫原性强的 LPS 作为疫苗的主要成分应用效果不错, 但其具有型特异性^[5], 加之制备困难, 限制了它的广泛应用。随着基因工程在鱼类免疫学领域的不断深入, 寻找病原体主要保护性抗原并克隆其基因表达出免疫原性更强, 保护力更高, 毒副作用更低的基因工程亚单位疫苗逐渐得到人们的关注。

张晓华^[12]分析比较了 32 种弧菌标准株的外膜蛋白发现, 多数菌株有三条相同的条带, 其中一条约为 27 kD, 说明 27 kD 的外膜蛋白在弧菌中广泛存在。用副溶血弧菌抗血清与多株副溶血弧菌的外膜蛋白进行免疫印迹分析, 发现其抗血清与多数副溶血弧菌的外膜蛋白有一条共同的 28 kD 免疫反应带, 与本研究重组蛋白 Omp K 的大小基本一致, 提示外膜蛋白 Omp K 可能是弧菌的保护性抗原之一。周丽等^[13]人分析了鳗弧菌和溶藻弧菌的 SDS-PAGE 电泳图谱后发现, 27 kD 外膜蛋白是这两种弧菌所共有的三种外膜蛋白之一。兔抗溶藻弧菌血清与该菌外膜蛋白主要有 2 条免疫反应带, 其中一条为 27 kD。

本研究从哈维氏弧菌的总 DNA 中成功克隆了外膜蛋白 Omp K 基因并在大肠杆菌中实现了高效表达。用纯化的融合重组蛋白免疫新西兰白兔获得了高效价的抗血清。免疫印迹显示抗血清和哈维氏弧菌外膜蛋白中分子量约为 27 kD 的蛋白产生了一条特异反应带, 提示哈维氏弧菌外膜蛋白 Omp K 是它的保护性抗原之一, 有望作为其疫苗的有效成分在大黄鱼哈维氏弧菌病的防治中发挥作用。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish, 2nd ed [M]. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, United Kingdom, 1993.
- [2] 林克冰, 刘家富. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学, 1999, (4): 58 - 62.
- [3] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(2): 178 - 181.
- [4] 张晓华, Robe P. 副溶血弧菌的外膜蛋白及其抗原性研究

- [J]. 中国水产科学,1997,4(4):49-53.
- [5] 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.
- [6] Gudding R, Lillehaug A. Recent developments in fish vaccinology[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999,72(1-2):203-212.
- [7] 高崧,吴晓东,张扬,等. 禽大肠杆菌外膜蛋白、脂多糖疫苗的免疫保护试验[J]. 中国兽医学报,2002,22(5):457-459.
- [8] Bøgvold J, Stensvåg K, Hoffman J, et al. Electrophoretic and immunochemical analysis of surface antigens of the fish pathogens *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida*[J]. Journal of Fish Disease,1990,13:293-301.
- [9] Inoue T, Matsuzaki S, Tanaka S, et al. A 26 kD outer membrane protein, OmpK, common to *Vibrio species* is the receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995,125(1):101-105.
- [10] Inoue T, Matsuzaki S, Tanaka S, et al. Cloning and sequence analysis of *Vibrio parahaemolyticus* OmpK gene encoding a 26 kD outer membrane protein, OmpK, that serves as receptor for a broad-host-range vibriophage, KVP40[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995,134,(2-3):245-249.
- [11] Filip C, Fletcher G, Wulff J L, et al. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium lauryl sarcosinate[J]. Journal of Bacteriology,1973,115:717-722.
- [12] 张晓华. 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] 周丽,刘洪明,战文斌,等. 鳃弧菌、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.