

3种美人鱼发光杆菌疫苗对卵形鲳鲹的免疫效果

苏友禄, 冯娟, 郭志勋, 王瑞旋, 徐力文, 姜敬哲, 王江勇

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州510300)

摘要:用美人鱼发光杆菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* 制备外膜蛋白(OMP)、脂多糖(LPS)及甲醛灭活全菌(FKC)3种疫苗,分别腹腔注射卵形鲳鲹 *Trachinotus ovatus*,在免疫后第7、14、21、28天进行尾静脉采血,检测试验鱼的白细胞吞噬活性、溶菌酶活力以及血清凝集抗体效价等免疫指标.与对照组相比,OMP、LPS和FKC均能显著提高所测的免疫指标($P < 0.05$),白细胞吞噬百分比、吞噬指数和血清溶菌酶活力在免疫第14~21天内,保持较高的水平,而血清抗体滴度则在免疫第14天后维持在较高的水平.免疫第28天后,测得LPS或OMP免疫组的鱼体增质量率明显高于FKC免疫组($P < 0.05$),同时进行人工感染,LPS、OMP和FKC免疫组的相对保护率分别为66.7%、60.0%和38.8%.说明注射美人鱼发光杆菌的LPS或OMP疫苗能给卵形鲳鲹提供良好的免疫保护效果.

关键词:美人鱼发光杆菌;疫苗;卵形鲳鲹;免疫效果

中图分类号:S941.4

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2011)03-0105-06

The Immune Efficiency of Three Vaccines of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to *Trachinotus ovatus*

SU You-lu, FENG Juan, GUO Zhi-xun, WANG Rui-xuan, XU Li-wen, JIANG Jing-zhe, WANG Jiang-yong
(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The vaccines of formalin-killed bacterial cells (FKC), outer membrane protein (OMP) and lipopolysaccharide (LPS) were prepared from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and were immunized respectively to golden pompano, *Trachinotus ovatus*, via intraperitoneal injection. The phagocytes activities, lysozyme activities and agglutinating antibody activities were assayed on 7, 14, 21, and 28 days after immunization. The fish immunized with LPS, OMP and FKC showed significantly higher phagocytes activities, lysozyme activities and agglutinating antibody activities than the control group ($P < 0.05$). The phagocytic percentage (PP), phagocytic index (PI) and lysozyme activities were at higher level between 14 and 21 days whereas the agglutinating antibody titers were the highest after 14 days of injection. The mass gain rate (MGA) in fish immunized with LPS or OMP were significantly higher than those of FKC ($P < 0.05$) after 28 days of immunization. The study showed that relative percent survival rates of lipopolysaccharide, outer membrane protein and formalin-killed bacterial cells were 66.7%, 60.0% and 38.8%, respectively. It appeared that LPS or OMP of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* could provide higher immune efficiency.

Key words: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; vaccines; *Trachinotus ovatus*; immune efficiency

卵形鲳鲹 *Trachinotus ovatus* 属鲈形目鲹科鲳鲹亚科鲳鲹属, 俗名金鲳, 是一种暖水性鱼类, 广泛分布于世界各大洋, 在东南亚、澳大利亚、日本、美洲热带和温带的大西洋海岸等地均有分布, 在中国的东海、南海和黄海, 特别是广东、广西、海南和福建沿海均有一定的资源量^[1]. 卵形鲳鲹具有肉质鲜美、生长

收稿日期:2010-08-19

作者简介:苏友禄(1981—),男,助理研究员,硕士;通信作者:冯娟(1973—),女,副研究员,博士,E-mail:juanf@21cn.com

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2008TS08,2008YD02)

快速、食性简单、抗病力强、适高温、高盐养殖的特点,深受养殖者和消费者的欢迎,是一种养殖前景较好的优良品种^[2],随着养殖密度提高和近海环境污染的日益严重,卵形鲳鲹的病害也逐渐增多^[3-5].近年来,在海南沿海的一些养殖场爆发一种由细菌引起的疾病,引起大规模的卵形鲳鲹死亡,经济损失严重,作者所在的课题组从患病鱼体中分离到1株病原菌,经鉴定为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,具有较强的致病力^[6].由美人鱼发光杆菌杀鱼亚种引起的疾病现称发光杆菌病(Photobacteriosis),以前称巴斯德菌病(Pasteurellosis),能引起多种海水鱼类发病,死亡率有时高达100%^[7].上世纪90年代海水鱼类发光杆菌病开始在欧洲爆发,到本世纪初仍在地中海和日本等地爆发流行,造成严重的经济损失^[8].

在传统防治方法中,抗生素和化学药物被作为主要手段大量的使用,使病原生物产生抗药性的同时,对环境、食品安全以及人体健康存在潜在的危害,受到人们的日益关注,而疫苗的使用正是符合水产养殖业要求的疾病控制手段.关于鱼类对甲醛灭活全菌(Formalin-killed cells,FKC)免疫应答方面的报道很多,其结果证实免疫对象能对所接种的菌苗产生不同水平的免疫应答^[9-11].脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)是大多数革兰阴性菌细胞壁的主要成分,由多糖、类脂和蛋白质组成,多糖部分具有较强的抗原性.LPS可直接激活机体的B细胞,导致体液免疫应答,能促进鱼体产生特异性的抗体,对养殖鱼类具有比较强的免疫原性和免疫保护作用^[12-13].外膜蛋白(Outer membrane proteins,OMP)是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,它镶嵌于细菌外膜的中间,在维持细菌外膜结构、物质转运方面发挥着重要作用,细菌的主要OMP免疫原性很强,是重要的保护性抗原^[14-15],作为一种潜在的重要抗原越来越受到人们的关注^[16].目前,国内外控制和预防美人鱼发光杆菌所致疾病的报道不多,本研究制备美人鱼发光杆菌OMP、LPS和FKC3种疫苗,分别免疫卵形鲳鲹,检测其对卵形鲳鲹的免疫指标、免疫保护力和生长情况的影响,确定3种疫苗对卵形鲳鲹免疫效果,为该病的免疫防治提供参考.

1 材料与方法

1.1 疫苗的制备

1.1.1 细菌的培养 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种

TOS1菌株采用脑心浸汁琼脂培养基于28℃培养24h,转接于脑心浸汁液体培养基,28℃、180 r/min摇床培养18h后收集菌体用于灭活菌苗、外膜蛋白和脂多糖的制备.

1.1.2 甲醛灭活全菌(FKC)疫苗的制备 将培养的细菌离心收集沉淀,用灭菌的PBS,调成 1.8×10^8 cfu/mL的浓度,加入终体积分数为0.25%的甲醛,28℃灭活24h后,以平板培养法检查灭活效果,确认彻底灭活后,保存在4℃冰箱中备用.

1.1.3 外膜蛋白(OMP)疫苗的制备 OMP的制备参照Peng等^[17]用Sarkosyl提取OMP的方法,用紫外分光光度计测量OMP含量.并用灭菌PBS调节质量浓度至0.5 mg/mL,保存在4℃冰箱中备用.

1.1.4 脂多糖(LPS)疫苗的制备 LPS的制备参照李华等^[18]的方法,用苯酚-硫酸法测量总糖的含量.并用灭菌PBS调节质量浓度至0.5 mg/mL,保存在4℃冰箱中备用.

1.2 试验用鱼及分组

卵形鲳鲹购自海南省陵水新村某养殖场,体质量约50g,外观无伤,游动活泼、摄食正常.试验在南海水产研究所陵水实验站进行,卵形鲳鲹暂养在36个1 m³水体的玻璃钢桶中,置于通风的室内,温度在(27.0±1.5)℃,水源为经紫外线照射和砂滤处理的天然海水,小型充气机全天充气,暂养7d后进行正式试验.每天换水1次,投喂商品饲料2次.试验共用鱼360尾,分成4组,即LPS免疫组、OMP免疫组、FKC免疫组和PBS对照组,每组用9个桶,每桶放卵形鲳鲹10尾.以腹腔注射的方式在各对应组分别接种LPS、OMP和FKC3种疫苗,对照组注射灭菌PBS,每尾鱼注射0.1 mL.各组中前3个桶的鱼用于免疫指标测定,中间3个桶的鱼用于免疫保护率测定,后3个桶的鱼用于鱼体增质量测定.

1.3 免疫指标的测定

在注射后的第7、14、21、28天,分别在LPS免疫组、OMP免疫组、FKC免疫组和PBS对照组的前3个桶中取卵形鲳鲹6尾进行尾部采血.所采血液样品分为2份:一份用5.0 mg/mL肝素钠抗凝后获得血细胞,用于白细胞吞噬活性的测定;另一份按常规法收集血清,用于溶菌酶活力和血清凝集效价免疫指标的测定.

1.3.1 白细胞吞噬活性 参照李惠芳等^[11]的白细胞吞噬活性测定的方法,按下式计算吞噬百分比(Phagocytic percentage,PP)和吞噬指数(Phagocytic index,PI): $PP = (100 \text{ 个白细胞中参与吞噬的细胞数} / 100) \times 100\%$, $PI = 100 \text{ 个白细胞内吞噬菌体的总}$

数/100.

1.3.2 溶菌酶活力 采用溶菌酶试剂盒(购于南京建成生物工程研究所)测定.

1.3.3 血清凝集效价 抗体凝集效价用常规的96孔板全菌微量凝集试验法检测,抗原为 1.8×10^8 cfu/mL 甲醛灭活的 TOS1 全菌.

1.4 相对免疫保护率的测定

在注射28 d后,分别在LPS免疫组、OMP免疫组、FKC免疫组和PBS对照组的中间3个桶中取卵形鲳鲅30尾.之前用改良寇氏法计算出美人鱼发光杆菌杀鱼亚种TOS1菌株对卵形鲳鲅半致死浓度(LD_{50}),且在 $10LD_{50}$ 时,对卵形鲳鲅的致死率为85%左右^[6],因此按 $10LD_{50}$ 的浓度腹腔注射TOS1活菌液0.1 mL/尾,攻毒后正常饲养,连续观察10 d,统计死亡率,按下式计算各疫苗免疫组对卵形鲳鲅的相对保护率(Relative percent survival, RPS).

$RPS = (\text{对照组死亡率} - \text{免疫组死亡率}) / \text{对照组死亡率} \times 100\%$.

1.5 鱼体增质量率的测定

分别在LPS免疫组、OMP免疫组、FKC免疫组和PBS对照组的后3个桶中取卵形鲳鲅30尾,于注射后0和28 d,分别称每桶的平均体质量,按下式计算各组鱼的增质量率(Mass gain rate, MGR).

$MGR = (\text{鱼体末质量} - \text{鱼体始质量}) / \text{鱼体始质量} \times 100\%$.

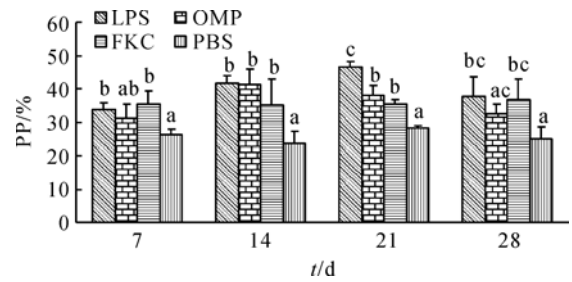
1.6 数据处理统计

试验数据采用SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),同时进行Duncan's多重比较,图形处理用Excel进行.

2 结果与分析

2.1 白细胞吞噬活性

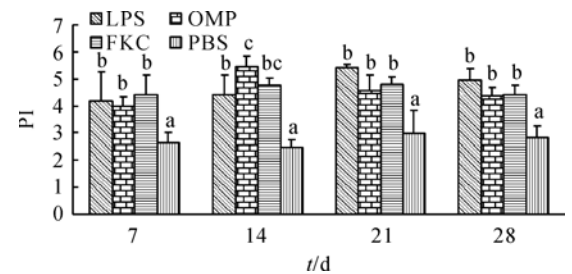
不同免疫时间测定各免疫组卵形鲳鲅的白细胞吞噬百分比和吞噬指数变化见图1、图2.由数据统计结果可知,除了免疫后第7天和第28天,OMP免疫组的白细胞吞噬百分比与对照组差异不显著外,在免疫后时间点内各免疫组白细胞吞噬活性显著高于对照组($P < 0.05$).说明单独免疫美人鱼发光杆菌的OMP、LPS和FKC,均可显著提高卵形鲳鲅白细胞吞噬活性.由图1、图2可看出,大致在免疫后第14天至第21天,卵形鲳鲅的白细胞吞噬活性保持在较高的水平,其中LPS免疫组达到峰值的时间迟于OMP免疫组.



同一时间点凡有一相同字母标记的值表示差异不显著(Duncan's法, $P > 0.05, n = 3$).

图1 不同免疫时间各组卵形鲳鲅白细胞吞噬百分比(PP)比较

Fig. 1 Comparison of phagocytic percentage (PP) in leucocytes after *Trachinotus ovatus* immunized



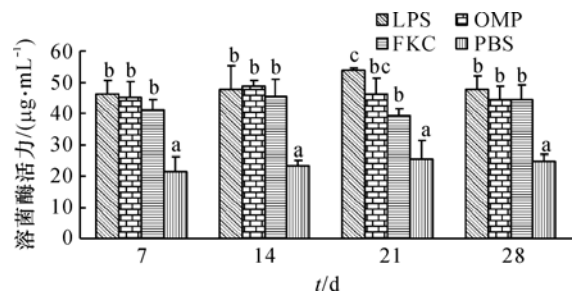
同一时间点凡有一相同字母标记的值表示差异不显著(Duncan's法, $P > 0.05, n = 3$).

图2 不同免疫时间各组卵形鲳鲅白细胞吞噬指数(PI)比较

Fig. 2 Comparison of phagocytic index (PI) in leucocytes after *Trachinotus ovatus* immunized

2.2 血清溶菌酶活力

免疫后各组血清溶菌酶活力显著高于对照组($P < 0.05$)(见图3),说明单独免疫美人鱼发光杆菌的OMP、LPS和FKC,均可显著提高卵形鲳鲅血清中溶菌酶活力.免疫后第21天,LPS免疫组的溶菌酶活力最强,与FKC免疫组呈显著性差异($P < 0.05$),除此之外,在同一时间段内,各免疫组溶菌酶活力差异不显著.总体来看,OMP免疫组溶菌酶活力表现得比较稳定,而FKC免疫组溶菌酶活力较弱.



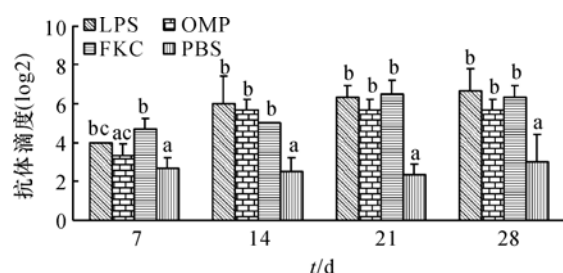
同一时间点凡有一相同字母标记的值表示差异不显著(Duncan's法, $P > 0.05, n = 3$).

图3 不同免疫时间各组卵形鲳鲅血清中溶菌酶活力比较

Fig. 3 Comparison of lysozyme activity in serum after *Trachinotus ovatus* immunized

2.3 血清中凝集抗体效价

免疫后各组血清凝集抗体效价显著高于对照组 ($P < 0.05$) (见图 4), 仅在免疫后第 7 天, OMP 免疫组与对照组差异不显著. LPS 及 OMP 免疫组于第 14 天抗体效价显著升高 ($P < 0.05$), 随后, LPS 免疫组的抗体效价从 $2^{6.00}$ 小幅增加到 $2^{6.67}$, 而 OMP 免疫组则基本维持在 $2^{5.67}$ 的水平. FKC 免疫组的抗体效价于第 21 天达到峰值 $2^{6.50}$ 后缓慢下降. 结果显示, 单独免疫美人鱼发光杆菌的 LPS、OMP 和 FKC 均可使卵形鲳鲹血清中抗体滴度显著持久地提高.



同一时间点凡有一相同字母标记的值表示差异不显著 (Duncan's 法, $P > 0.05$, $n = 3$).

图 4 不同免疫时间各组卵形鲳鲹血清中凝集抗体效价比较

Fig. 4 Comparison of agglutinating antibody titers in serum after *Trachinotus ovatus* immunized

2.4 相对免疫保护率

各组以 10LD_{50} 的剂量活菌攻毒, 卵形鲳鲹相对免疫保护率见表 1. LPS 免疫组的相对保护率最高, OMP 免疫组次之, FKC 免疫组最低, 结果表明单独免疫美人鱼发光杆菌的 LPS 和 OMP, 对卵形鲳鲹具有很好的免疫保护, 而 FKC 对卵形鲳鲹产生了较差的免疫保护.

表 1 免疫卵形鲳鲹对 TOS1 菌株攻击的相对保护率的比较

Tab. 1 Comparison of RPS of immunized *Trachinotus ovatus* against challenge of TOS1 strain

组别	攻毒尾数	存活尾数	相对保护率/%
LPS	30	24	66.7
OMP	30	22	60.0
FKC	30	19	38.8
PBS	30	12	0

2.5 卵形鲳鲹的增质量率

在免疫的 28 d 内, 卵形鲳鲹的增质量情况见表 2, 通过数据分析发现, LPS 免疫组增质量率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而 FKC 免疫组的增质量率却明显低于对照组 ($P < 0.05$), OMP 免疫组增质量率和对照组差异不显著.

表 2 LPS、OMP 和 FKC 对卵形鲳鲹增质量的影响¹⁾

Tab. 2 Effect of LPS, OMP and FKC on growth in *Trachinotus ovatus*

组别	始质量/g	末质量/g	增质量率/%
PBS 对照组	50.60 ± 0.98	89.33 ± 1.29a	76.58 ± 3.07a
LPS 免疫组	50.30 ± 0.17	91.37 ± 0.47b	81.64 ± 0.35b
OMP 免疫组	49.23 ± 1.16	88.10 ± 0.90a	78.98 ± 2.43ab
FKC 免疫组	50.57 ± 0.76	88.76 ± 2.08c	70.55 ± 1.82c

1) 同列数据后凡具有一个相同字母标记的值表示差异不显著 (Duncan's 法, $P > 0.05$, $n = 3$).

3 讨论

3.1 3 种疫苗鱼体非特异性免疫功能的影响

作为较低等的脊椎动物, 鱼类的特异性免疫机制还很不完善, 多数硬骨鱼类体内只有一种免疫球蛋白 IgM, 非特异性免疫在鱼类的免疫防御中发挥着重要作用^[19]. 白细胞具有吞噬异物的能力, 其数量和吞噬活性的高低可直接反映出鱼类非特异性免疫功能的强弱^[20]. 该试验的 3 种疫苗均在免疫后显著提高鱼体的白细胞吞噬活性, 与孟小亮等^[21] 研究结果基本一致. 对卵形鲳鲹各免疫组峰值出现的时间和峰值大小进行比较, 发现 OMP 免疫组的白细胞吞噬活性在免疫后第 14 天达到峰值, 比 LPS 免疫组提前 7 d, 但 LPS 免疫组的峰值较大, FKC 免疫组的白细胞吞噬活性则表现得比较平稳. 单红等^[22] 用灭活菌苗免疫南方鲇 *Silurus meridionalis*, 发现在免疫后第 4 天吞噬百分比和吞噬指数均达到最高值, 到免疫的第 21 天开始下降, 而黑鲷 *Sparus macrocephalus* 在免疫后第 28 天, 白细胞吞噬百分数和吞噬指数才达到最高值^[23], 可看出不同鱼体的免疫反应是有差异的. 鱼类的粘液、血清和某些淋巴组织中, 广泛分布着溶菌酶, 其溶菌活力可反映机体对外源微生物侵袭的防御能力, 也可作为衡量免疫功能及机体状态的指标^[24]. 该研究表明各免疫组的溶菌酶活力显著高于对照组, 结果与在虹鳉 *Oncorhynchus mykiss*、石斑鱼 *Epinephelus* 等上的研究相吻合^[25-26], 值得注意的是, LPS 免疫组的卵形鲳鲹能持久保持在一个相对较高的水平, 到免疫后第 28 天才稍微下降. 周永灿等^[27] 认为, 接种一定浓度的 LPS 可以提高卵形鲳鲹对嗜麦芽假单胞菌 *Pseudomonas maltophilia* 的抗性, 能显著提高白细胞吞噬能力, 增强非特异性免疫功能. 而有学者则认为, 虽然 LPS 疫苗在较短时间内使受免鱼血清中的溶菌酶活力快速升高, 但持续时间不长^[23]. 从对卵形鲳鲹的免疫结果可知, 各免疫组能

持久地提高外周血白细胞的吞噬活性及血清中溶菌酶活力,说明分别接种3种疫苗均能提高鱼体的非特异性免疫功能。

3.2 3种疫苗对鱼体血清抗体水平和免疫保护力的影响

鱼体对入侵的免疫原会产生针对其抗原决定簇的特异性抗体,这是鱼类免疫系统的特征之一,常将检测体内抗体效价用于评估免疫接种的效果和病原微生物对鱼体所产生的影响^[28]。该试验结果表明,LPS、OMP和FKC均可使卵形鲳鲅血清抗体水平明显提高,各免疫组也存在一定差异,OMP免疫组抗体水平达到峰值时间最快,但LPS和FKC组抗体峰值均高于OMP组。测免疫保护力的人工感染试验是参照王瑞旋等^[6]的方法,其所用的卵形鲳鲅平均体质量为17.4 g,当攻毒剂量为10LD₅₀时,卵形鲳鲅死亡率接近85%,而本次试验对照组卵形鲳鲅平均体质量达到89.3 g,用同样的剂量攻毒时,死亡率为60%,这样死亡率存在差异,可能是两次所用卵形鲳鲅大小不同造成的,推测随着鱼体的增长,对病原菌抵抗力增强所致,但用此攻毒剂量足以评价疫苗的免疫效果,由结果可知,LPS和OMP免疫组的相对保护率(RPS)分别达到66.7%和60.0%,高于FKC免疫组(38.8%),效果比较明显。值得关注的是,FKC组的血清抗体水平并不明显低于LPS和OMP组,但相对保护率却很低,有研究者对斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus*^[21]、翘嘴鲌 *Chuatsi Basilewsky*^[29]接种嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 的灭活菌苗或亚单位苗时也表现出类似的结果。美人鱼发光杆菌灭活苗的抗原虽然可以使鱼体产生较高的凝集抗体,但是部分抗体可能不是保护抗体,因此在机体抵抗致病菌攻击时,并不能很好地起到保护作用。有研究发现迟缓爱德华 *Edwardsiella tarda* 的FKC和OMP均能为鱼体提供良好的免疫保护,但LPS和OMP协同作用的效果则更明显^[9]。本试验是单独免疫注射,能直接地比较LPS、OMP及FKC之间的免疫效果差异,将为后续研制偶联疫苗提供有用的数据。

3.3 3种疫苗对鱼体生长的影响

本文比较了3种疫苗对卵形鲳鲅生长情况,结果表明各组鱼体的增质量率大小顺序为:LPS免疫组>OMP免疫组>对照组>FKC免疫组,数据分析发现,OMP疫苗对鱼体的增质量影响不大,LPS疫苗可明显促进卵形鲳鲅的生长($P<0.05$),而FKC疫苗则显著抑制卵形鲳鲅的生长($P<0.05$)。有研究认

为,在现代养殖业生产中,疫苗对预防、控制和消灭传染病发挥着极其重要的作用,免疫接种一方面保护了动物机体免受病原的侵害,另一方面也作为一种特殊的应激因子引起免疫应激^[30],当动物处于免疫应激时,免疫应激通过直接作用于动物的中枢神经系统(Central nervous system, CNS)或引发CNS细胞中细胞因子的合成,从而改变神经内分泌系统,减少了生长激素的分泌^[31],这样就会直接影响动物的生长发育及生产性能。在鱼用疫苗的制备过程中,为了减少免疫原上因抗原量太大而对受免鱼体造成过强免疫负荷,通常采用各种方法消除菌体上的无效抗原(包括弱抗原)^[11,32],由于FKC无效抗原明显多于LPS和OMP,可能是造成FKC免疫组卵形鲳鲅增重率低的重要因素。

参考文献:

- [1] 区又君,李加儿.卵形鲳鲅的早期胚胎发育[J].中国水产科学,2005,12(6):786-789.
- [2] 张健东,周晖,陈刚,等.卵形鲳鲅血细胞发生的观察[J].水生生物学报,2007,31(6):780-787.
- [3] 黄郁葱,简纪常,吴灶和,等.卵形鲳鲅结节病原的分离与鉴定[J].广东海洋大学学报,2008,28(4):49-53.
- [4] 但学明,李安兴,林小涛,等.卵形鲳鲅对刺激隐核虫的免疫应答和免疫保护研究[J].水生生物学报,2008,32(1):13-18.
- [5] 许海东,区又君,郭志勋,等.神经坏死病毒对卵形鲳鲅的致病性及外壳蛋白基因序列分析[J].上海海洋大学学报,2010,19(4):482-488.
- [6] 王瑞旋,冯娟,苏友禄.卵形鲳鲅美人鱼杀鱼亚种的分离鉴定[J].中国水产科学,2010,17(5):1020-1027.
- [7] LÓPEZ-DÓRIGA M V, BAMES A C, SANTOS N M, et al. Invasion of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum[J]. Microbiology, 2000, 146(1):21-30.
- [8] ADELAIDE A, ÂNGELA C, NEWTON C M G, et al. Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants[J]. Mar Drugs, 2009, 7(3):268-313.
- [9] 王燕,张晓华,吕俊超,等.养殖大菱鲆病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制[J].中国水科学,2009,16(3):394-403.
- [10] 史维舟,陈昌福,纪国良,等.草鱼对点状气单胞菌菌苗的免疫反应[J].华中农业大学学报,1994,13(5):497-501.

- [11] 李惠芳,汪成竹,陈昌福. 斑点叉尾鲟对 3 种致病菌灭活菌苗的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2006,25(6):654-658.
- [12] 叶剑敏,简纪常,吴后波,等. 溶藻弧菌脂多糖的化学成分分析及其对石斑鱼的毒性[J]. 水生生物学报,2004,28(5):574-576.
- [13] 贾亚东,汪成竹,陈昌福. 中华鳖对嗜水气单胞菌粗脂多糖(LPS)的免疫应答[J]. 华中农业大学学报,2007,26(2):228-232.
- [14] MAJI S, MALI P, JOARDAR S N. Immunoreactive antigens of the outer membrane protein of *Aeromonas hydrophila*, isolated from goldfish, *Carassius auratus* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2006, 20(4):462-473.
- [15] KUMAR G, RATHORE G, SENGUPTA U, et al. Isolation and characterization of outer membrane proteins of *Edwardsiella tarda* and its application in immunoassays [J]. Aquaculture, 2007, 272(1-4):98-104.
- [16] 黄新新,陆承平. 迟缓爱德华菌全菌及外膜蛋白的免疫力比较[J]. 免疫学杂志,2002,18(3):187-189.
- [17] PENG Xuan-xian, YE Xin-tai, WANG San-ying. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies [J]. Vaccine, 2004, 22(21/22):2750-2756.
- [18] 李华,石存斌,钱永华,等. 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[J]. 中国水产科学, 2007, 14(6):990-995.
- [19] 徐增辉,陈汉忠,陈明,等. 海豚链球菌疫苗对罗非鱼免疫功能的影响[J]. 大连水产学院学报,2008,23(6):413-418.
- [20] 秦启伟,吴灶和,周永灿,等. 饵料维生素 C 对青石斑鱼的非特异性免疫调节作用[J]. 热带海洋,2000,19(1):58-63.
- [21] 孟小亮,陈昌福,吴志新,等. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗对斑点叉尾鲟免疫原性比较研究[J]. 淡水渔业,2009,39(4):49-53.
- [22] 单红,张其中,刘强平,等. 灭活菌苗免疫的南方鲇外周血液细胞免疫指标的变化[J]. 中国水产科学,2005,12(3):275-280.
- [23] 王海芳,孙际佳,赵典惠,等. 溶藻弧菌疫苗对黑鲟的免疫效果研究[J]. 华南农业大学学报,2008,29(1):97-101.
- [24] 王海丽,杨季芳. 南极超微细菌 ANT52 (*Alteromonas stellipolaris*) 外膜蛋白和脂多糖的提取物对黑鲟的免疫活性研究[J]. 海洋与湖沼,2009,40(2):242-248.
- [25] ACKERMAN P A, IWAMA G K, THORNTON J C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout [J]. Aquatic Ammal Health, 2000, 12(2):157-164.
- [26] 简纪常,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.
- [27] 周永灿,张本,陈雪芬,等. 嗜麦芽假单胞菌脂多糖的制备及其在卵形鲳鲹中的免疫反应[J]. 水产学报,2002,26(2):143-148.
- [28] ELLIS A E. Immunity to bacteria in fish [J]. Fish and Shellfish Immunology, 1999, 9(4):291-308.
- [29] 陈昌福,李静,周文豪,等. 翘嘴鲃细菌性败血症的免疫预防研究[J]. 华中农业大学学报,1996,15(5):475-479.
- [30] 袁志航,文利新. 动物免疫应激研究进展[J]. 动物医学进展,2007,28(7):63-65.
- [31] COLEMAN E S, SARTIN J L. Endotoxin stimulates in vitro pituitary growth hormone release in eicosanoid-dependent manner [J]. American Journal of Veterinary Research, 1996, 57(11):1662-1667.
- [32] ESTEVE-GASSENT M D, NIELSEN M E, AMARO C. The kinetics of antibody production in mucus and serum of European eel (*Anguilla anguilla* L.) after vaccination against *Vibrio vulnificus*; Development of a new method for antibody quantification in skin mucus [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2003, 15(1):51-61.

【责任编辑 柴 焰】