

鱼类病原鳃弧菌致病相关因子及分子生物学*

VIRULENCE FACTORS OF PATHOGENIC *Vibrio anguillarum* OF FISHES AND THEIR MOLECULAR BIOLOGY

陈吉祥 于德华 李 筠

(中国海洋大学生命学院 青岛 266003)

中图分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)08-0011-05

鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是一种对水产鱼类危害严重的细菌病原, 其流行区域广泛, 能引起世界范围内的淡、海水鱼类及其它养殖动物发生弧菌病, 常给水产养殖业造成巨大的经济损失^[1]。鳃弧菌的致病性与许多毒力因子有关, 包括由质粒编码的铁吸收系统、细胞外溶血毒素、细菌鞭毛蛋白、胞外蛋白酶等。本文论述了鳃弧菌的主要致病性相关因子及研究进展。

1 细菌入侵及粘附作用

鳃弧菌感染途径主要是皮肤和消化道。Horne 等观察到鳃弧菌在虹鳟鱼的各个肠段定殖, 并在感染 100 min 达到最大附着量^[2]; Olsson 报道大菱鲆幼苗口服鳃弧菌后, 可在胃部存活几小时, 进而停留在肠道, 并在粪便中繁殖, 其中 50% 以上的大菱鲆脾脏含有鳃弧菌^[3]; Kanno 发现浸泡感染后 12 h, 鳃弧菌开始在皮肤定居, 随后感染肝、脾、肌肉、鳃和肠道等, 通过透射电镜分析发现, 在直肠上粘附的细菌数量明显高于其它肠道部位, 表明鳃弧菌亲和细胞可能位于直肠内皮细胞^[4]。

在粘附阶段, 细菌鞭毛及膜蛋白有重要的作用, Milton 等认为由鳃弧菌 *flaA* 基因编码的 40 ku 的鞭毛蛋白是细菌毒力所必需, 而且 *flaA* 还和另外 3 个分子量为 41 ku、42 ku 和 45 ku 的鞭毛蛋白有关, 它们与 40 ku 蛋白的 N-末端氨基酸序列同源性达 82% ~ 88%。对 *flaA* 基因序列进行缺失诱变得程度不同的突变株, 用 N-末端 180 bp 序列缺失或 C-末端 153 bp 序列缺失突变株浸泡感染鱼时其 LD₅₀ 增加 70 ~ 700 倍, 经腹腔注射感染时 LD₅₀ 没有变化; 而双末端缺失的突变株和全基因缺失的突变株浸泡和腹腔注射的 LD₅₀ 都增加 10⁴ 倍^[5]; Ormonde 等用失去运动性和

部分失去运动性的突变株感染鲑鱼卵细胞, 结果其感染能力明显减弱, 说明运动性能增加细菌在体内外的感染能力; Wang 利用 2 株致病性鳃弧菌 811218-5W 和 G/Virus/5(3) 和 2 株非致病性鳃弧菌 (*V. anguillarum*) ATCC33559 和 S215193(2), 分析其对 3 种鱼细胞的粘附能力, 结果表明 4 株菌对不同细胞系的粘附能力没有显著差异, 抑制剂、糖类、低温 (4 °C) 等不影响致病株 811218-5W 对 EPC 细胞的超粘附 (Super-adherence) 能力, 而含半乳糖的糖类能抑制非致病鳃弧菌 G/Virus/15(3) 粘附能力^[6]。费氏弧菌的一个 32.5 ku 的外膜蛋白 ompU 与细菌感染初期的粘附作用有关, 该蛋白与霍乱弧菌的 ompU 蛋白的氨基酸同源性为 58.08%, 而与发光杆菌 (*Photobacterium profundum*) ompL 蛋白的同源性为 45.5%, ompU 基因缺失的突变株的附着能力比野生菌降低 60%^[7]。

2 毒力质粒及铁吸收系统

Crosa 等从 O1 型致病鳃弧菌中发现了编码铁吸收系统相关蛋白的质粒 pJM1, 该质粒大小为 67kbp, 已确认了 5 个基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码低分子量铁载体蛋白和特异性铁转运蛋白, 其中一个基因编码外膜蛋白 2 (outer member protein, OMP2), 另一个编码 40 ku 多肽, 也是一个膜蛋

* 国家 863 计划项目 2001AA622070 号, 国家 973 计划 G1999012005 号 和中国博士后科学基金项目。
第一作者: 陈吉祥, 出生于 1963 年, 博士, 副教授, 研究方向: 海洋微生物学与免疫学, E-mail: BETCEN@ouc.edu.cn

收稿日期: 2002-08-09; 修回日期: 2003-01-20

白,与 OMP2 一起在转运铁进入细胞质中发挥重要作用,其余的基因涉及 OMP2 表达的调控和铁的转运;铁载体合成后扩散到环境中,形成铁复合物,附着于 OMP2 蛋白,从而使铁进入细菌细胞^[8,9]。Tolmasky 等从 pJM1 质粒克隆了组氨酸脱羧酶基因,编码一个 386 氨基酸残基的蛋白,分子量 44.2 ku,其氨基酸序列与磷酸吡哆醛依赖性组氨酸脱羧酶相似,组氨酸脱羧酶基因缺失的诱变株不能在限制铁的环境生存,也不产生铁载体,往培养基中加入组氨酸则铁载体能重新合成,证实了组氨酸脱羧酶在铁吸收过程中的作用,同时也进一步证实组氨酸是合成铁载体的前体物质,但组氨酸脱羧酶不受培养基中铁离子浓度的调节^[10]。

质粒编码的铁吸收系统在缺铁的环境中能得到高效表达,而铁调节基因的表达与调控非常复杂,它涉及到细菌细胞的信号转导、转录控制及转录后调节等过程。Wertheimer 发现鳃弧菌铁转运基因的调节蛋白 AngR 分子量为 110 ku,AngR 是一个铁载体合成的正向调节蛋白,不仅调节铁载体的产生,而且调节铁转运蛋白 *fatA*、*fatB* 基因的转录。此外,铁载体本身及 AngR 蛋白转录激活因子 (TAF) 分别都能增加铁转运基因 *fatA* 和 *fatB* 的转录,但当三者同时存在时,调节作用最大^[11]。

fatA、*fatB* 铁转运基因表达的反向调节是由一个染色体编码的铁吸收调节蛋白 (Fur 蛋白) 和一个 pJM1 质粒衍生的反义 RNA (RNA α) 来完成的。Fur 蛋白的氨基酸序列与霍乱弧菌和创伤弧菌有很高的同源性,C-末端序列是 Fur 蛋白的最可变序列,而在 N-末端保守区的 28~46 位的氨基酸也有一定变化。在细胞内铁离子的浓度高时,Fur 蛋白与铁离子形成复合物,抑制铁吸收系统许多编码基因及其铁调节基因的表达,Fur 还抑制 *angR* 基因的转录,此外,在反义 RNA α 合成的转录初始阶段也需要 Fur 蛋白,它不受细胞内铁离子状态的影响^[12]。

Pedersen 等对 18 株 O1 血清型鳃弧菌的质粒含量、铁载体及外膜蛋白的表达进行了研究,结果发现所有菌株在缺铁条件下都产生铁载体和诱导性外膜蛋白,而外膜蛋白 OM2 只有在含有 67 kbp 质粒(或类似质粒)的菌株产生。质粒类型分析和限制性酶切分析表明毒力质粒的大小在 26~80 kbp 之间,而 65~67 kbp 是最常见的质粒,这些质粒的限制性酶切图谱差别较大,细菌的病原性不受其他质粒的影响。他们还发现个别菌株虽然含有 67 kbp 质粒,产生铁载体和外膜蛋白,但对鱼却无致病性,这些菌株对鱼感染的 LD₅₀ 的变化范围较大^[13]。

从病鱼分离的 O3 血清型 (O3a 和 O3b) 菌株,同样能够在铁缺乏的条件下生长,产生儿茶酚型铁载体,并合成铁调节外膜蛋白,表明 O3 血清型菌也有一个有效的铁吸收系统,然而根据其来源不同存在着明显差异。与 O1 和 O2 血清型相比,O3 血清型菌体有一个特有的蛋白质,从病鱼分离的 O3 血清型比从环境中分离的菌株还多一个蛋白,而且只有这些菌株才更具有毒力。Toranzo 发现从条纹鲈中分离的鳃弧菌尽管不含质粒,但所有菌株能在缺铁的环境中生长,而且产生新的 OMP 和铁载体,DNA 杂交发现在其染色体 DNA 中存在与 pJM1 质粒杂交的序列,可能是质粒 DNA 已整合到这些菌株的染色体上^[14]。Mackie 和 Birkbeer 随后的研究表明在鳃弧菌染色体上存在一个独立的铁吸收系统,它不同于质粒编码的铁吸收系统,合成不同的外膜蛋白,不利用铁载体^[15]。

3 溶血素

鳃弧菌的溶血素毒性可能与被注射鱼的贫血症状有关,这些溶血素被认为是一种热不稳定酶,50℃ 加热 10 min 可灭活,最适 pH7.2~7.4,可以被神经节苷脂失活。在随后的试验中发现,鳃弧菌培养物在 20℃ 培养 19 h 后可检测到溶血素,39 h 达到峰值,以后开始下降,可能是溶血素产生于细菌生长的静止期,或者是该溶血素产生于细胞内,以后随着细菌细胞自溶而释放出来,也可能是细菌分泌无活性溶血素,随后被一种目前还未知的机制激活^[16,17]。Hirono 从鳃弧菌染色体 DNA 中克隆了一个 5 kbp 的 DNA 片段,该片段含有溶血素基因开放阅读框,由 2 253 bp 核苷酸序列编码 751 个氨基酸残基,其氨基酸序列与霍乱弧菌 El Tor 溶血素、创伤弧菌、嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌的溶血素氨基酸序列的相似性分别是 57.3%,52.8%,46.2% 和 43.7%。用 DNA 探针检测了 28 株 A 血清型和 I 血清型鳃弧菌,结果表明有 25 株菌都存在溶血素基因,用 PCR 方法可检测到人工感染鱼的组织中溶血素基因的存在^[18]。

4 脂多糖

脂多糖是革兰氏阴性细菌的外膜主要组份,O-特异性多糖链具有亲水性,带负电荷,可保护细菌抵抗吞噬细胞的吞噬作用,O-抗原的多样化,使细菌免遭体内已存在的抗体和消化酶的作用,对细菌本身有保护作用。脂多糖也是细菌主要的致病因子。脂多糖的类脂 A 可引起宿主产生非特异性的病理生理反应(内毒素反应)。Montero 和 Austin 等的研究表明脂多糖是哈维氏弧菌 E2 对对虾的致死性毒素的组成部

分^[19]。

Milton 等通过转座子诱变产生了一个鳃弧菌突变株 VAN20775. 1713, 该突变株与脂多糖合成相关的毒力基因 *virC* 由于插入转座子而失活, 不能正常表达表面抗原脂多糖, 当鱼腹腔注射该突变株时, 半数致死量 LD_{50} 增加了 10^5 倍^[20]; 用 Tn5-132 转座子插入获得了 2 个鳃弧菌诱变株 VAN20 和 VAN70, 通过腹腔注射和浸泡感染表明其毒性明显减弱, 对诱变株 VAN70 进一步研究发现, Tn5-132 转座子插入到了 *virA* 和其上游的 *virB* 基因上, 而 *virA* 和 *virB* 被认为是鳃弧菌表面脂多糖抗原合成的必需蛋白基因, 分别编码分子量为 36 ku 和 42 ku 的蛋白质, 分析表明除了 *virA* 和 *virB* 基因失活外, 没有丢失任何其他毒力因子^[21]。Boesen 等研究了不同血清 O1 和 O2 鳃弧菌对虹鳟鱼血清杀菌活性的敏感性, 结果发现所有菌株能激活虹鳟鱼血清补体活性, O1 血清型中只有光滑型菌株对无抗体时补体的杀菌活力有抗性, 而 O2 型中 80% 的菌株即使在特异性抗体存在时, 也表现对血清的抵抗力。分析还发现脂多糖 O- 抗原的大小与菌体对血清的抗性相关, 当 O2 血清型菌在富含葡萄糖的培养基中生长时, 产生的高分子量 O- 抗原单位要少, 在该条件下生长的菌株对血清杀菌活力更敏感, 表明高分子量的 O- 抗原侧链能阻止补体对细菌的损害作用^[22]。研究发现弧菌的脂多糖还与血细胞凝集活性有关, 在细菌的粘附过程中发挥作用。

O- 特异性多糖链构成革兰氏阴性菌的菌体抗原即 O- 抗原, O- 抗原的巨大差异是细菌血清分型的基础。Grisez 根据脂多糖的不同将鳃弧菌分为 16 个不同的血清型, 根据纯化的 LPS 银染结果分析表明每一种血清型的脂多糖类型不同, 通过定量凝集反应和斑点杂交分析发现在 O2 血清型中存在 O2a 和 O2b 两个血清型^[23], Santon 等用微量凝集、斑点杂交及定量凝集反应对 O1, O2, O3 血清及亚型进行了鉴定, 结果表明 O3 血清还有 O3a, O3b 两个血清亚型^[24]。Pedersen 通过制备抗体及分析脂多糖, 用 Western 印迹和血清学反应结果发现, 除现有的 16 个血清型外, 还存在 7 个新的血清型 O17~O23, 而且个别菌株与这 23 个血清型仍然不发生反应, 表明还存在新的血清型, 在所有的血清型中 O1, O2 和 O3 是鱼类的主要病原菌^[25]。

脂多糖是鳃弧菌的良好的保护性抗原, 可刺激机体产生特异性免疫反应。Salati 用粗提的鳃弧菌脂多糖腹腔注射免疫香鱼, 随后的感染试验表明免疫组的死亡率是 0, 而对照组的死亡率是 86.7%, Nakamura 用脂多糖制备物注射鲤鱼、日本鳃鲷、牙鲆、虹鳟、真鲷等都诱导产生了良好的免疫反应^[26]。

5 外膜蛋白

外膜蛋白 (outermembrane protein, OMP) 在维持细菌细胞结构稳定、细胞的物质交换等方面有重要作用, 外膜蛋白在细菌的致病过程中也起着十分重要的作用, 如细菌侵袭、粘附、细菌毒素的分泌、铁的摄取等。Santos 用 SDS-PAGE 电泳分析了不同来源和血清型的鳃弧菌的外膜蛋白, 结果发现所有菌株含有分子量范围为 14~97 ku 的蛋白组分, O1 血清型具有相同的外膜蛋白, 即一个分子量 40 ku 的主要蛋白带和 2 个分子量 45 ku 和 55 ku 次要蛋白带; O2 血清型的主要外膜蛋白稍有不同, 分子量大小范围在 35 ku 和 38 ku 之间, 在 O2 血清型中有 45 ku 和 65 ku 的 2 个抗原蛋白。而 O3 血清型的主要外膜蛋白带在 37 ku 和 48 ku 之间。免疫印迹显示, O1、O2、O3 血清与各自的外膜蛋白有强烈的反应。属于 O2a 和 O2b 亚型的血清只与同型的细菌外膜蛋白反应, O3a 亚型的抗血清却与 O3a 和 O3b 亚型的外膜蛋白都发生反应^[24]。

Simon 发现鳃弧菌的 10 个血清型中都含有一个分子量为 40 ku 的外膜蛋白, 由 O1 血清型 AO18 制得的 40 ku 的主要外膜蛋白抗体与所有弧菌血清型外膜蛋白起反应, 但不与大肠杆菌外膜蛋白反应, 该蛋白的二级结构中有大量的 β -片层结构, 其功能与大肠杆菌 OMPc 相似, 是一个普遍存在的常见的融合性孔蛋白^[27]。40 ku 孔蛋白也许是鳃弧菌适应渗透压和温度变化的调节因子, 使鳃弧菌在海水和淡水环境中都能生存。在 O1 血清型中一个分子量为 86 ku 的外膜蛋白 OMP2 由 pJM1 质粒编码, 它和另一个由染色体编码的外膜蛋白 OMP3 一起在铁摄取过程发挥重要作用, 在富铁条件下其合成受抑制^[28]; Aeckersberg 等认为费氏弧菌 (*V. fischeri*) 外膜蛋白 ompU 在细菌粘附和定殖过程中有重要作用^[29]。外膜蛋白也是鳃弧菌的很好的保护性抗原, Chart 和 Trust 从鳃弧菌分离的 2 个小分子量的外膜蛋白能有效地刺激机体的免疫反应^[30]。

6 胞外蛋白酶

Inamura 从一株 O1 血清致病鳃弧菌 PT-81049 分离到分子量为 36 ku 的蛋白酶, 该蛋白酶的最适 pH 为 7~8, 最适温度 50 °C, 被认为是一种金属蛋白酶, 该蛋白酶腹腔注射金鱼和小鼠的 LD_{50} 分别为 1.7 $\mu\text{g/g}$ 和 1.6 $\mu\text{g/g}$ ^[31]。Farrell 等从鳃弧菌 514 的培养上清液中分离到能水解酪蛋白的胞外蛋白酶, SDS-PAGE 电泳分析纯化的蛋白酶分子量为 38 ku, 另外他们还发现一个分子量 40 ku 组分, 也有蛋白酶活

性, 该蛋白酶也能被 EDTA 所抑制, 而不被 PMSF 抑制, Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 能使由 EDTA 络合而失活的蛋白酶活力部分恢复^[32]。Milton 从病原鳃弧菌中分离到金属蛋白酶, 克隆的鳃弧菌金属蛋白酶基因由 1836bp 组成, 编码 611 个氨基酸残基组成的多肽链, 完整蛋白的分子量为 66 ku^[33], 酶的催化活性中心有一个保守的锌结合区 HEXXH, 2 个组氨酸残基作为 Zn^{2+} 的第 1, 2 配体, 在靠中心 C 末端的第 25 个谷氨酸残基作为第 3 个锌配体, 与霍乱弧菌、创伤弧菌和解蛋白弧菌的金属蛋白酶同属一类。

坏死性组织损伤是许多病原细菌蛋白酶的致病机制, 如创伤弧菌金属蛋白酶能水解基底膜胶原的 2 个组分: 片层素 (laminin) 和 IV 型胶原, 而 IV 型胶原是形成基底膜的骨架, 毛细血管的稳定性是靠血管内皮细胞表面和基底膜结合而完成的, 因此, 特异性降解 IV 型胶原可引起基底膜的损坏, 使血管破裂, 从而使血液成分包括红细胞漏到周围组织中^[34]; 霍乱弧菌金属蛋白酶能激活霍乱毒素 (CT), 持续刺激膜结合腺苷酸环化酶; 此外, 蛋白酶还能增加血管通透性, 产生细胞毒性作用。

但也有人对某些蛋白酶的直接致病作用提出不同的看法, Shao 利用诱变技术产生了蛋白酶基因缺失的创伤弧菌诱变株, 结果发现小鼠腹腔注射该诱变株后, 对小鼠的毒力反而增加了 10 倍, 而且该诱变株从腹腔进入血液的能力, 对血管通透性的促进作用及利用血红蛋白及转铁蛋白能力与原始野生株并未有多大差别, 因此他们认为创伤弧菌金属蛋白酶在对鼠的感染毒力方面不是必需的, 他们还发现诱变菌株培养上清中的溶细胞毒素活性是野生毒株的 2 倍, 而且存在更长时间, 可能是诱变株口服感染后毒力增强的原因^[35]。Denkin 研究了鱼胃肠粘膜对鳃弧菌的基因表达诱导作用, 诱导作用开始于添加胃粘膜 60~90 min 的时间内, 蛋白酶的活力是未诱导培养细胞的 70 倍。他们还发现蛋白酶缺失的诱变株能够在含胃肠粘膜的培养基生长, 但并不显示蛋白酶活性。他们认为蛋白酶活性可能增加毒力, 但酶活力的丧失并不意味着毒力丧失^[36]。

7 其它胞外产物

鳃弧菌产生胞外产物 (ECP) 还包括了其它细菌外毒素、各种酶类和细胞毒素等许多成分。Kodama 从鳃弧菌培养物的无细胞上清液中分离到 2 种毒素组分, 对虹鳟鱼和小鼠有致死毒性, 用 SDS-PAGE 电泳分析发现 GI-A 组分由 44 ku 和 34 ku 蛋白组成, 44 ku 蛋白带有糖基, 注射 GI 和 GI-A 组分的鱼和鼠外周血管紊

乱, 毒性物质对过碘酸钾敏感, 而对胰蛋白酶和丙酮有抗性, 100 °C 20 min 可以使该毒素完全失活, 该毒素无溶血性和蛋白酶活性, 注射毒素死亡的虹鳟鱼表现肠道和腹部肌肉出血, 腹部积液^[37]。Perez 等从鳃弧菌胞外产物中分离到一个神经毒性乙酰胆碱酯酶^[38]。Faris 从鳃弧菌胞外产物中发现了一个新的神经毒素样物, 能引起鳗鲡、鲈鱼的惊厥、扭曲运动等神经症状, 该毒素也是致命的^[39]。

参考文献

- Egidius E. *Vibriosis: pathogenicity and pathology, a review*. *Aquaculture*, 1987, 67: 15-18
- Horne M T, Baxende A. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its roles in pathogenesis. *J Fish Disease*, 1983(6): 461-471
- Olsson J C, Joborn A, Westerdahl A, et al. Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L), intestine a partial of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *J Fish Disease*, 1996, 19: 225-234
- Kanno T, Nakai T, Muroga K. Scanning electron microscopy on the skin surface of ayu *Plecoglossus altivelis* infected with *Vibrio anguillarum*. *Disease of Aquatic Organism*, 1990(8): 73-75
- Milton D L, O'Toole R, Horstedt P, et al. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 1 300-1 319
- Wang X H, Oon H L, Ho G W P, et al. Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in *Vibrio* -fish epithelial cell interactions. *Microbiology*, 1998, 144(11): 2 987-3 002
- Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, et al. *Vibrio fischeri* outer membrane protein ompU plays a role in normal symbiotic colonization. *J Bacteriol*, 2001, 183(220): 6 590-6 597
- Crosa J H. A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature*, 1980, 283: 566-568
- Actis L A, Tolmasky M E, Farrell D H, et al. Genetic and molecular characterization of essential components of the *Vibrio anguillarum* plasmid-mediated iron-transport system. *J Biol Chem*, 1988, 263(6): 2 853-2 860
- Tolmasky M E, Actis L A, Crosa J H. A histidine decarboxylase gene encoded by the *Vibrio anguillarum* plasmid pJMI is essential for virulence: Histamine is a precursor in the biosynthesis of anguibactin. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(1): 87-95
- Wertheimer A M, Verweij W, Chen Q. Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infect Immun*, 1999, 67(12): 649-509
- Tolmasky M E, Wertheimer A M, Actis L A, et al. Characterization of the *Vibrio anguillarum* fur gene: Role in

- regulation of expression of the FatA outer member protein and catechols . Journal of Bacteriology, 1994, 176 (1): 213-224
- 13 Pederson K, Gram L, Austin D A, et al. Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 compared to plasmids, outer membrane protein profile, and siderophore production. Journal of Applied Microbiology, 1997, 82: 365-371
 - 14 Toranzo A E, Barja J L, Potter S, et al. Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake Bay . Infection Immunity, 1983, 39: 1 220-1 227
 - 15 Mackie C, Birkbeck T H. Siderophores produced by *Vibrio anguillarum* in vitro and in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) . J Fish Diseases, 1992, 15: 37-45
 - 16 Lida T, Honda T. Hemolysins produced by *Vibrios* . Journal of Toxicology. Toxin Reviews, 1997, 16: 215-227
 - 17 Munn C B. Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum*. In: Ahne W (ed) . Fish Disease, Third COPRAQ Session. Berlin: Springer Verlag, 1980. 69-74
 - 18 Hirono I, Masuda T, Aoki T. Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum* . Microbiol Patho - genesis, 1996, 21: 173-182
 - 19 Montero A B, Austin B. Characterization of extracellular products from an isolate of *Vibrio harveyi* recovered from diseased post-larval *Penatus vannamei* (Bonne) . Journal of Fish Diseases, 1999, 22: 377-386
 - 20 Milton D L, Norqvist A, Wolf-Watz H. Sequence of a novel virulence-mediating gene, virC, from *Vibrio anguillarum*. Gene, 1995, 164 (1): 95-100
 - 21 Norqvist A, Wolf-Watz H. Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Infection and Immunity, 1993, 61(6): 2 434-2 444
 - 22 Boesen H T, Pedersen K, Larsen J L. *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) . serum: role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. Infection Immunity, 1999, 67 (1): 293-301
 - 23 Grisez L, Ollevier F. Comparative serology of the marine fish Pathogen *Vibrio anguillarum* . Applied Environ Microbiol, 1995, 61 (7): 4 367-4 373
 - 24 Santos Y, Pazos F, Bandin I, et al. Analysis of antigens present in the extracellular products and cell surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2 and O3. Applied Environ Microbiol, 1995, 61(7): 2 493-2 498
 - 25 Pedersen K, Grisez L, Van-Houdt R, et al. Extended serotyping for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. Curr Microbiol, 1999, 38(37): 183-189
 - 26 Nakamura Y, Nakai T, Muroga K. Induction of antibody producing cells in some fishes by immunization with *Vibrio anguillarum* O-antigen. Fish Pathology, 1990, 25: 225-230
 - 27 Simon M, Mathes A, Blanch A, et al. Characterization of a porin from the outer membrane of *Vibrio anguillarum*. Journal of Bacteriology, 1996, 178: 4 182-4 188
 - 28 Davey M L, Hancock R E W, Mutharia L M. Influence of culture conditions on expression of the 40 kilodalton porin protein of *Vibrio anguillarum* serotype O2 . Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 138-246
 - 29 Aeckersberg F, Lupp C, Feliciano B, et al. *Vibrio fisheri* outer membrane protein ompU plays a role in normal symbiotic colonization . J Bacteriol, 2001, 183(22): 6 590-6 597
 - 30 Chart H, Trust T J. Characterization of the surface antigens of the marine fish Pathogens, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. Canadian Journal of Microbiology, 1984, 30: 703-710
 - 31 Inamura H, Muroga K, Nakai T. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. Bull Japan Soc Sci Fish, 1985, 51: 1 915-1 920
 - 32 Farrell D H, Crosa J H. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacteria *Vibrio anguillarum*. Biochemistry, 1991, 30: 3 422-3 436
 - 33 Milton D, Norqvist A, Wolf-Watz H. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. J Bacteriol, 1992, 174(22): 7 235-7 244
 - 34 Miyoshi S, Wakae H, Tomochika, et al. Functional domains of a zinc metalloprotease from *Vibrio vulnificus*. J Bacteriol, 1997, 179: 7 606-7 610
 - 35 Shao C P, Hor L I. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. Infect Immun, 2000, 68(6): 3 569-3 573
 - 36 Denkin S M, Nelson D R. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3 555-3 560
 - 37 Kodama H, Moustafa M, Mikami T, et al. Characterization of extracellular substance of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice. Microbiol Immunol, 1985, 29(10): 909-920
 - 38 Perez M J, Rodriguez L A, Nieto T P. The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component of the extracellular products of Vibrionaceae strains. Journal of Applied Microbiology, 1998, 84: 47-52
 - 39 Faris A, Abdullah S Z, Latif R A, et al. Neurotoxin-like effects of *Vibrio anguillarum* extracellular toxin on Malaysian aquaculture eels, catfish and tilapia . Fri News, 1996, 1(2): 5-6

(本文编辑:刘珊珊)