

两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析

石存斌 胡学峰 陈献稿 李凯彬 吴淑勤

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘要:采用硫酸铵分级盐析从哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株培养物中提取其胞外产物,并对胞外产物的一些特性进行了分析。结果表明,两株哈维氏弧菌的胞外产物均具有较强的毒力,对鲫鱼的半致死剂量 LD_{50} 为 7.1g 蛋白/g 鱼体重;均具有淀粉酶、酪蛋白酶、脂肪酶活性,而无脲酶和明胶酶活性;除 EcGY020401 株胞外产物对斜带石斑 (*Epinephelus coioides*) 红细胞有较强溶血作用外,对小鼠、鲫、人 O 型血等红细胞的溶血性都较弱或无;对草鱼吻端成纤维细胞 (PSF) 都具有细胞毒性。此外,经聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶柱层析和离子交换柱层析,对 SpGY020601 株的胞外产物中蛋白酶进行了初步提纯,SDS-PAGE 分析得一分子量约为 38Kda 的蛋白酶,该蛋白酶对鲫鱼有致死毒性,半致死剂量为 3.3g 蛋白/g 鱼体重。

关键词:哈维氏弧菌;胞外产物;溶血作用;细胞毒性;致病性;蛋白酶

中图分类号:S941.42 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2007)01-0083-05

弧菌是引起水产动物特别是鱼类流行性疾病的
一种重要病原,曾经在世界范围内引起养殖鱼类的
流行病暴发。随着海水鱼类养殖迅速发展,弧菌病
报道逐渐增多^[1-5]。一般认为,弧菌的致病作用是
多种因素组合而成的,每个因素的重要性因菌株的
不同而变化,但多数研究认为,胞外产物 (Extracellular
products, ECP),包括外毒素、胞外酶等,是决定病原
菌毒力的重要因素^[6-11]。

国内对于弧菌的致病性,研究较多的是鳃弧菌、
溶藻弧菌、副溶血弧菌和拟态弧菌等,有关哈维氏弧
菌 (*Vibrio harveyi*) 毒力因子的研究还不多见。Lee K
K 等^[9]提纯和分析了哈维氏弧菌的 ECP,认为半胱氨
酸蛋白酶是哈维氏弧菌胞外产物中主要的致病因子。
作者先后从广东濒临死亡的斜带石斑 (*Epinephelus
coioides*) 和红鳍笛鲷 (*Lutianus erythropterus*) 中分离出两
株有较强毒力的哈维氏弧菌,为了解此两株哈维氏弧
菌的主要致病因子和致病机制,对其胞外产物的一些
特性进行比较分析,并对其中一株菌的胞外产物进行
了初步分离纯化。

1 材料与方法

1.1 试验鱼 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 购自广东省

广州市某养殖场,平均体重为 10.2 ± 1.3 g,在室内暂
养观察 7d,确认健康后用于毒性试验。

1.2 实验菌株 哈维氏弧菌 EcGY020401 株,分离
于广东省阳江市闸坡某场濒死的斜带石斑;哈维氏
弧菌 SpGY020601 株,从广东省阳江市东平某海水养
殖场患溃疡病的红鳍笛鲷中分离到。经常规生化反
应鉴定,并结合 16S rRNA 或热激蛋白 (HSP60) 基因
部分序列测定,确认为哈维氏弧菌^[12]。毒力试验证
明,哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株对
斜带石斑鱼的 LD_{50} 分别为 2.7×10^6 CFU/g 和 $4.7 \times$
 10^6 CFU/g。

1.3 胞外产物的提取 两株哈维氏弧菌分别接种
到 TSB 培养基 (加 1.5%NaCl),180r/min 28℃ 摇床培
养 48h,培养物于 Beckman J-E 型离心机中 4
9500r/min 离心 30min,去菌体,上清液中加入固体硫
酸铵至 20% 的饱和度,4℃ 静置 4h,9500r/min 离心
30min,弃沉淀。再于上清液中加入固体硫酸铵至
60% 的饱和度,4℃ 静置 4h,9500r/min 离心 30min,弃
上清液,沉淀溶于 50mmol/L Tris-HCl (pH7.4) 缓冲
液中,4℃ 50mmol/L PB (pH7.4) 磁力搅拌器搅拌下
对相同缓冲液透析,期间换缓冲液 5 次,聚乙二醇
(PEG) 20000 浓缩,得粗提 ECP。分装保存于 -50

收稿日期:2005-10-26;修订日期:2006-02-10

基金项目:国家八六三计划项目 (2001AA622050);广东省科技计划项目 (2001B20501) 资助

作者简介:石存斌 (1964—),男;副研究员;主要从事水产动物病害研究。E-mail: scbyxh@pub.guangzhou.gd.cn

通讯作者:吴淑勤, Tel: 020-81616813, E-mail: wushuqin001@tom.com

备用。

胞外产物中蛋白质含量的测定采用 Bradford 法。

1.4 对鲫鱼的致死性试验 经过预试验,将粗提 ECP 调整到适当浓度,2 倍比稀释后腹腔注射鲫鱼,每组 10 尾,每尾 0.2mL;对照组注射无菌的等量生理盐水(0.65 %NaCl)。统计死亡情况,连续观察 7d,按照 Reed-Muench 法计算 ECP 的 LD₅₀。

1.5 底物酶活性的测定 参考莫照兰等^[15]的方法,分别用 PBS(pH7.4)配置含明胶(0.4%)、酪蛋白(0.4%)、淀粉(0.2%)、吐温 80(1.0%)、尿素(2.0%,加酚红指示剂)的 1%的琼脂平板,打孔,每孔加入 10μL ECP(蛋白含量约 350μg/mL),28℃ 湿盒恒温孵育 24h。向明胶平板中加入酸性的氯化汞溶液;向酪蛋白平板中加入 10%三氯乙酸溶液;向淀粉平板中加入鲁哥氏碘液。观察平板,以出现透明圈(明胶、酪蛋白、淀粉平板)或不透明圈(吐温 80 平板)或出现红色(尿素平板)为阳性。

1.6 溶血性测定 在每个无菌离心管中加 100μL 无菌生理盐水(含 0.85 %NaCl),加 ECP(约 350μg/mL) 100μL,进行倍比稀释,分别加入小鼠、人 O 型血、鲫鱼等不同来源的 1%红细胞悬液 100μL 于每管中,37℃ 孵育 1h,4℃ 过夜,记录 50%溶血的稀释度最高的倒数为溶血价。设无菌生理盐水组为阴性对照。

1.7 细胞毒性测定 将浓缩处理的 ECP(蛋白含量约 350μg/mL)过滤除菌,用细胞维持液(含 2%的小牛血清的 1640 培养液)作倍比稀释,加入到长成单层草鱼吻端成纤维细胞(PSF)的 96 孔细胞培养板中,每孔 150μL,置 20℃ 密闭培养,定时观察细胞的病变情况。设加 2%的小牛血清的 1640 培养液为正常对照。

1.8 蛋白酶活力的测定和抑制剂的影响 参考魏玉西等^[13]的方法略作修改,用偶氮酪素(azocasein)(Sigma)作为底物,200μL ECP 加入 1.8mL 含偶氮酪素 0.1mol/L 的 PBS(pH7.4)中,28℃ 放置 30min,加入 2mL 10%的三氯乙酸(TCA)终止反应,4℃ 11000r/min 离心 5min,取上清 2mL 加入 1mol/L 的 NaOH 溶液 2mL,用分光光度计测定 A₄₅₀,设空白对照,以 A₄₅₀ 每增加 0.001 为一个酪蛋白酶活力单位。

将经硫酸铵盐析提取的 ECP 与各种化学试剂混合,25℃ 保温 1h 后,检测蛋白酶活力的变化,以不加化学试剂的 ECP 中蛋白酶作为对照(100%相对酶活力)。

1.9 聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶柱层析 采用 AKTA prime 层析系统,HiPerpTM 16/60 SephacrylTM S-200 柱预先用 50mmol/L 的 PBS(含 0.15mol/L NaCl, pH7.4)

平衡,提取的胞外产物上样 3mL,以同样的 PBS 缓冲液洗脱,流速 0.5mL/min,每管 3mL 自动分部收集,检测 A_{280nm}紫外吸收峰,绘制洗脱曲线,同时检测各收集管的蛋白酶活性。

1.10 离子交换柱层析 先用 A 缓冲液(pH7.4, 0.05mol/L PB)、B 缓冲液(含 1mol/L NaCl 的 pH7.4, 0.05mol/L PBS)平衡层析柱,再将上面层析得到的具蛋白酶活性部分合并浓缩后上样,流速 5mL/min,梯度洗脱,检测 280nm 紫外吸收峰,每管 3mL 自动分部收集,测定收集管的蛋白酶活性,合并有较高蛋白酶各管。

1.11 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 将胞外产物提取过程中有蛋白酶活性的部分收集浓缩,采用常规方法进行 SDS-PAGE 电泳分析,12%的分离胶,4%的浓缩胶,每孔上样 20μL;起始电压为 100V,待样品进入分离胶后恒压 150V;电泳完毕,考马斯亮蓝 R-250 染色,扫描保存图片。

2 结果与分析

2.1 ECP 对鱼类的毒性

哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株的胞外产物对鲫鱼均有较强的毒性,在腹腔注射 6h 后,陆续有鱼死亡。死亡的鲫鱼除胸鳍基部和注射部位附近发炎变红外,无其他明显症状。

按 Reed-Muench 法计算, EcGY020401 株和 SpGY020601 株的胞外产物对鲫鱼的毒力相当, LD₅₀ 均为 7.1μg/g 鱼体重。

2.2 ECP 底物酶活性

酶活性实验结果表明,哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株的胞外产物均具有淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性,但不具有脲酶、明胶酶活性。

2.3 ECP 的溶血性

分别测定了哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株的 ECP 对小鼠、鲫鱼、斜带石斑、人 O 型血的红细胞的溶血性,除 EcGY020401 株对小鼠的红细胞有较强的溶血性外,其余各组的溶血价都较低(约为 1/4 左右);两株弧菌的胞外产物对 O 型人血的红细胞均无溶血作用。

2.4 ECP 细胞毒性

两株哈维氏弧菌 ECP 均能引起细胞病变。ECP 浓度较大时,能使草鱼吻端成纤维细胞(PSF)很快脱落;在浓度较低时,细胞并不脱落,观察到的是缓慢的病变过程(一般需 48—72h 才明显可见),主要表现为细胞肿胀,边缘不清晰,有些细胞表面出现空

洞,有些细胞融合。对照组正常草鱼吻端成纤维细 胞呈纤维状,边缘清晰。

表 1 两株哈维氏弧菌的 ECP 对不同红细胞的溶血价比较
Tab. 1 Hemolytic ability of different ECP from strain EcGY020401 and SpGY020601

胞外产物来源 Origin of ECPs	小鼠红细胞 Erythrocyte of mouse	鲫红细胞 Erythrocyte of crucian carp	斜带石斑红细胞 Erythrocyte of estuary cod	人 O 型血红细胞 Erythrocyte of human
Strain EcGY020401	1 256	1 4	1 4	0
Strain SpGY020601	1 4	1 2	1 4	0

经测定, EcGY020401 株 ECP 可引起 PSF 病变的最小浓度为 2.0μg/ mL, SpGY020601 株为 4.0μg/ mL。

2.5 SpGY020601 株 ECP 中蛋白酶的纯化

硫酸铵盐析获得的 SpGY020601 株的 ECP, 经 HiPerp™16/ 60 Sephacryl™ S-200 凝胶柱层析, 得到 3 个洗脱峰(图 1), 经过蛋白酶活性检测, 其中第二个

峰具有蛋白酶活性, 其他二峰基本无蛋白酶活性。收集第二个峰的所有管, 放入透析袋中用聚乙二醇(PEG) 20000 浓缩, 经过 HiPerp 16/ 10 Q XL 离子交换层析, 得到 4 个主要洗脱峰(图 2), 蛋白酶活性检测, 其中第二个峰具有蛋白酶活性。收集第二个峰的洗脱液, 经过浓缩, 得到初步纯化的蛋白酶。

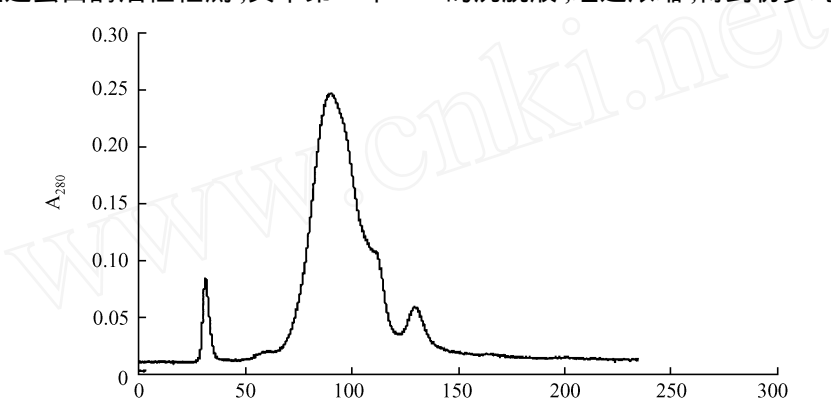


图 1 哈维氏弧菌 SpGY020601-ECP 的 S-200 凝胶层析
Fig. 1 Elution of the ECP of strain SpGY020601 with HiPerp™16/ 60 Sephacryl™ S-200 chromatography

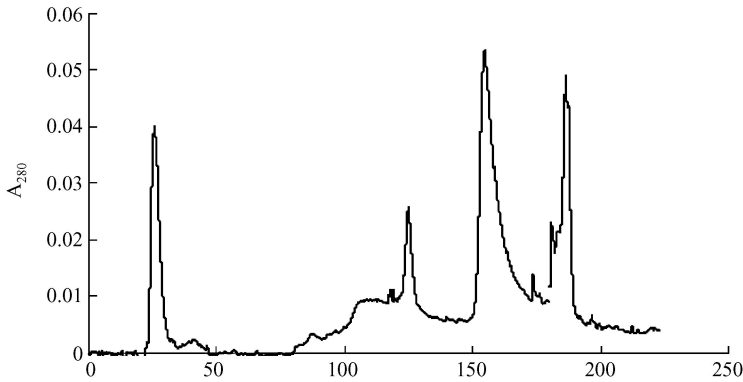


图 2 哈维氏弧菌 SpGY020601-ECP 的 HiPerp 16/ 10 Q XL 离子交换层析
Fig. 2 Elution of the ECP of strain SpGY020601 with HiPerp 16/ 10 Q XL ion exchange chromatography

2.6 ECP 电泳图谱

将 SpGY020601 株胞外产物的纯化过程中各步所得的各组分, 进行 SDS-PAGE 电泳比较(图 3), 从图中可以看出, 经过 Sephacryl™S-200 凝胶层析纯化的蛋白主要有两条带, 分别为 35 kDa 和 38 kDa; 再经

过 HiPerp 16/ 10 Q XL 离子交换层析, 得到一条单一的主带, 分子量约为 38 kDa。

2.7 ECP 中蛋白酶活性影响因子

通过蛋白酶的抑制剂试验(表 2), 发现丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF), 金属蛋白酶抑

制剂 EDTA 对 ECP 蛋白酶都只有轻微的抑制作用,金属离子 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 都能增强蛋白酶的活性, Zn^{2+} 的增强能力最高, Fe^{3+} 有轻微抑制作用。

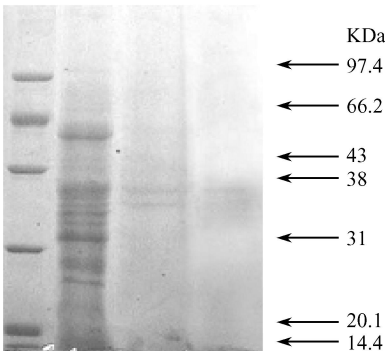


图3 SpGY020601 株胞外产物的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE profiles of extracellular products of strain SpGY020601

1. 分子量标准 2. 硫酸铵盐析后 ECP 3. 凝胶层析后 ECP
4. 离子交换层析后 ECP

Lane 1: Marker; Lane 2: ECP after salt precipitation; Lane 3: ECP collected after gel chromatography; Lane 4: ECP collected after ion exchange chromatography

表2 抑制剂对 SpGY020601 株 ECP 中蛋白酶活性的影响

Tab. 2 The effect of inhibitors on the protease activity of ECP of strain SpGY020601

试剂	浓度 (mmol/L)	相对酶活力 (%)
Reagent	Concentration	Relative activity of protease
PMSF	10	91.4
EDTA	10	96.3
CaCl_2	10	116.0
ZnCl_2	10	126.0
MgCl_2	10	107.4
FeCl_3	10	93.8
对照	—	100

3 讨论

哈维氏弧菌是海水养殖鱼类的重要致病菌。一些研究表明^[14-46],哈维氏弧菌能产生胞外蛋白酶,这些蛋白酶能导致宿主组织损伤,协助病原菌对宿主的感染。本研究中发现,分离的哈维氏弧菌 Ec-GY020401 株和 SpGY020601 株的胞外产物对鲫鱼表现很强的毒力,且死亡的症状和用活菌感染致死的鲫鱼症状基本相同,表明胞外产物是重要致病因子。两株哈维氏弧菌胞外产物对多种红细胞的溶血性较低,而对草鱼吻端成纤维细胞的毒性很强,同时在其中检测到较强的蛋白酶活性,说明两株哈维氏弧菌致病性可能是由蛋白酶的细胞毒性引起。底物酶活

性还检测到胞外产物还具有淀粉酶脂肪酶,这些酶也可能与致病性相关。

哈维氏弧菌 SpGY020601 株的 ECP 经过凝胶层析、离子交换层析纯化后得到一条 38kDa 的具有蛋白酶活性的蛋白质,毒性试验证明该蛋白对鲫鱼具有毒性。Liu 等^[16]从对虾上分离到一株哈维氏弧菌,纯化 ECP,得到一个 38kDa 的主带,确认是半胱氨酸蛋白酶。本试验所纯化出的 ECP 蛋白带的大小和 Liu 等报道的一致,且对丝氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制剂都不敏感,是否为半胱氨酸蛋白酶有待进一步证实。

参考文献:

[1] Liu X Z, Zou X L, Mo X Y, et al. Study on the pathogen of vibriosis isolated from diseased *Epinephelus* sp. in cage mariculture [J]. *Tropic Oceanology*, 1994, 13(1): 81—86 [刘秀珍, 邹晓理, 莫小燕, 等. 海水网箱养殖石斑鱼病原菌研究. 热带海洋, 1994, 13(1): 81—86]

[2] Wu H B, Pan J P. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of *Seriola dumerili* in marine cage culture [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(2): 171—174 [吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖高体鲷弧菌病致病菌研究. 水产学报, 1997, 21(2): 171—174]

[3] Xiao H, Li J, Wang X H, et al. Studies on pathogens of rotted gill and rotted caudal fins of seaperch (*Lateolabrax japonicus*) fry [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1999, 29(1): 87—93 [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病原菌的研究. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 1999, 29(1): 87—93]

[4] Chang J B, Gong X H, Sun F X, et al. Preliminary studies on a pathogen of vibriosis of cultured *Paralichthys olivaceus* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2001, 22(1): 37—42 [常建波, 宫向红, 孙逢贤, 等. 养殖牙鲆弧菌病病原菌初步研究. 海洋水产研究, 2001, 22(1): 37—42]

[5] Xu B F, Lin N F, Yang J X, et al. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fujian Journal of Agriculture Sciences*, 2002, 17(3): 174—177 [许斌福, 林能锋, 杨金先, 等. 大黄鱼副溶血弧菌的分离、鉴定及致病力分析. 福建农业学报, 2002, 17(3): 174—177]

[6] Bradshaw J G, Shaj D B, Wehby A J, et al. Thermal inactivation of the Kanagawa hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in buffer and shrimp [J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49: 184—187

[7] Shinichi M, Kazuhiro S, et al. Purification and Characterization of a Hemolysin Produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Infection and immunity*, 1997, 65(5): 1830—1835

[8] Lee K K, Yu S R, Liu P C. Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Curr Microbiol*, 1997, 34: 110—117

[9] Mbu H J, Li J, Bao Z M, et al. Pathogenicity of extracellular products of *Vibrio parahaemolyticus* to *Penaeus chinensis* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2000, 31(3): 273—279 [牟海津, 李

- 筠,包振民,等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273—279]
- [10] Wu H B, Pan J P. Virulence mechanisms of pathogenic vibrio [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(4): 422—426[吴后波,潘金培. 病原弧菌的致病机理. 水生生物学报, 2003, 27(4): 422—426]
- [11] Wu H B, Pan J P. The characteristics of the exotoxin Vnr-Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(4): 409—412[吴后波,潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的理化特性. 水生生物学报, 2004, 28(4): 409—412]
- [12] Chen X G, Wu S Q, Shi C B, et al. Isolation and identification of pathogenetic *Vibrio harveyi* from estuary cod, *Epinephelus coioides* [J]. *Journal of Fishery Sciences of Chin*, 2004, 11(4): 313—317 [陈献稿,吴淑勤,石存斌,等. 斜带石斑鱼病原菌(哈维氏弧菌)的分离与鉴定. 中国水产科学, 2004, 11(4): 313—317]
- [13] Wei Y X, Wang J C, Cheng D L, et al. Purification and property of extracellular protease from *Vibrio anguillarum* [J]. *Chin J Appl Environ*, 2002, 8(4): 414—418[魏玉西,汪靖超,程殿林,等. 鳃弧菌胞外产物中蛋白酶的纯化及其性质. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 414—418]
- [14] Lee K K, Chen Y L, Liu P C. Hemostasis of Tiger Prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products and a toxic cysteine protease [J]. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 1999, 25(13): 180—192
- [15] Mo Z L, Chen S Y, Zhang P J. Properties of proteolytic toxin of *Vibrio anguillarum* from diseased flounder [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2002, 20(4): 316—322
- [16] Liu P C, Lee K K, Tu C C, et al. Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi* [J]. *Curr. Microbiol*, 1997, 35: 32—39

CHARACTERISTICS OF THE EXTRACELLAR PRODUCTS OF TWO PATHOGENIC VIBRIO HARVEYI STRAINS

SHI Cun-Bin, HU Xue-Feng, CHEN Xian-Gao, LI Kai-Bin and WU Shu-Qin

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Guangzhou 510380)

Abstract : *Vibrio harveyi* is a kind of important pathogenic bacteria for seawater animals, such as prawn, crab, clam, and ormer. Along with the development of seawater fish cage-culture in China, *Vibrio harveyi* also becomes a main cause of disease of cage-culture fish, including *Lutianus erythropterus*, *Seriola dumerili*, *Lateobrax japonicus*, *Epinephelus fario* and *Epinephelus coioides*. Some researches indicate that *Vibrio harveyi* can secrete extracellular products and result in the damnification of host tissue or result in the death of host when seriously.

Two *Vibrio harveyi* strains, EcGY020401 and SpGY020601, which were isolated from diseased *Epinephelus coioides* and *Lutianus erythropterus* in south China, were identified after morphological observation, biochemical characteristic analysis, and 16srRNA or HSP60 gene sequence detection. Both strains can cause death to freshwater fish and marine fish, such as crucian carp (*Carassius auratus*) and estuary cod (*Epinephelus coioides*) through artificial injection. In order to understand their pathogenetic mechanism, extracellular products (ECPs) of both strains were extracted with ammonium sulfate precipitation, and some characteristics of their ECPs such as exoenzymatic, hemolytic, toxic and cytotoxic activities were analyzed. Virulence experiments showed that ECPs of the two strains had quite strong virulence to crucian carp in that their LD₅₀ to crucian carp was about 7.1μg-protein/g fish weight. Both strains' ECPs have the activity of amylase, protease and lipase, but have not the activity of gelatinase and urease. Except that the ECP of strain EcGY020401 has stronger haemolytic activity to the red cell of grouper, the ECPs have very weak hemolysis to erythrocytes of human, mouse, estuary cod and crucian carp. Cytotoxic activity to the fish cell line PSF was detected in both ECPs, and the lowest cytotoxic concentration to PSF is 2.0μg/mL and 4.0μg/mL, respectively.

A main protease in ECPs produced by strain SpGY020601 was also purified following the steps of ammonium sulfate precipitation, gel filtration and anion-exchange chromatography. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed the estimated molecular mass of the protease is about 38kDa. The protease is lethal to crucian carp and the LD₅₀ is 3.3μg-protein/g. Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) had a little inhibitory effects on the activity of the protease, while Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ can enhance the protease' activity. These results indicated that the protease might be an alkaline cysteine protease.

Key words : *Vibrio harveyi*; Extracellular products; Hemolysis; Cytotoxicity; Pathogenicity; Protease