

鱼源溶藻弧菌胞外产物的特性研究

左凤琴 简纪常 吴灶和

(广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524025)

摘要:溶藻弧菌经胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA + 2%NaCl)培养48h后,培养物用PBS洗脱、离心,再经孔径0.22 μ m微孔滤膜过滤,制得胞外产物(Extracellular product, ECP)。经检测,该ECP具有淀粉酶、酪蛋白酶、卵磷脂酶和脂肪酶等4种酶活性,其中淀粉酶的活性最高,酪蛋白酶、脂肪酶活性次之,卵磷脂酶活性较低,未检测出明胶酶及脲酶活性;能溶解断斑石鲈(*Pomadasys hasta*)、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)和赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)的红细胞,而不能溶解鸡、羊及O型人红细胞;对小白鼠和石斑鱼的LD₅₀分别为0.08mg/g和0.17mg/g,95%可信限分别为0.06—0.12mg/g和0.07—0.28mg/g;50mmol/L EDTA和100mmol/L 苯甲基磺酰氟能使胞外蛋白酶(Extracellular proteinase, ECPase)的活性分别下降83.40%和51.32%;ECPase对热稳定性较差,碱性条件下活性较高,其最适温度为50℃,最适pH为8.0。

关键词:溶藻弧菌;胞外产物;特性

中图分类号:S917 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2006)05-0553-06

溶藻弧菌是海水中广泛存在的一种可引起人、鱼等患病的条件致病菌。早在1973年就提出该菌对人有致病性,可引起人食物中毒。其主要经肠道感染,导致病人腹泻,已从腹泻病人中分离到多株溶藻弧菌^[1-2]。海水养殖的鱼、虾和贝等均可感染该菌,引起严重的弧菌病^[3-6],使海水养殖业蒙受巨大的经济损失。

病原弧菌的胞外产物(Extracellular product, ECP)是引起养殖鱼类暴发性流行死亡的致病因子之一。Hare等^[7]和Lee等^[8]对溶藻弧菌ECP作了初步研究,而国内对分离的鱼源溶藻弧菌菌株ECP的研究却鲜有报道。本文提取了鱼源溶藻弧菌ECP,对ECP的部分生物学特性及理化性质作了研究,为进一步探讨ECP的致病机理、亚单位疫苗的研制及弧菌病的免疫防治提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 溶藻弧菌 本实验室从患弧菌病的赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)和红鳍笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)体内分离获得,保存于实验室。

1.2 实验动物 小白鼠购自广东医学院动物实验中心,体重为18—20g/只,雌雄各半。石斑鱼购自湛江市南三岛网箱养殖鱼排,体重为7—10g/尾。

1.3 胞外产物的制备 溶藻弧菌ECP的制备参照文献[8—10]的方法略加改动。方法如下:取1mL活化的菌液涂布于铺有无菌玻璃纸的胰酪大豆胨琼脂(TSA)(2%NaCl, w/v)平板培养基上,28℃培养48h,每皿中加入4mL PBS(pH7.2),洗下菌苔,4℃下10000r/min离心30min。上清液经孔径为0.22 μ m的微孔滤膜过滤,获得溶藻弧菌ECP,4℃冰箱保存。

1.4 溶藻弧菌ECP酶活性定性分析 参照文献[9,12]的方法。分别用蒸馏水配制无菌的含酪蛋白(1%)、脱脂奶(1%)、明胶(1%)、可溶性淀粉(0.2%)、蛋黄(2.5%)、吐温80(1.0%)、尿素(2.0%)酚红指示剂等7种琼脂平板(pH7.5),平板打孔后加20 μ L ECP,加等量生理盐水(0.85%)作阴性对照。35℃温育48h后向酪蛋白琼脂平板、脱脂奶平板中加入三氯乙酸溶液(10%, w/v);向明胶平板中加入酸性氯化汞溶液(0.1mol/L);向淀粉平板中加入鲁哥氏碘液,以出现透明圈(明胶、酪蛋白、脱

收稿日期:2004-12-07;修订日期:2006-04-20

基金项目:广东省自然科学基金项目(011812),广东省科技计划项目(2001A305030201),教育部重点项目(204108)

作者简介:左凤琴(1979—),女,27岁,硕士,主要从事水产经济动物病害的研究;E-mail:gdzjmartha@hotmail.com

通信作者:简纪常,博士,教授。Tel:0759-2339319;E-mail:jianjichang@21cn.com

脂奶、淀粉平板)或无透明圈(蛋黄,吐温 80 平板)或变成红色(尿素平板)者为阳性反应。

1.5 溶血活性 ECP 对羊红细胞溶血活性测定按 Ichige 等^[13]方法进行。向 1% 琼脂中加 5% 脱纤维羊血制成血琼脂平板, 平板打孔后, 加 10 μ L ECP, 加等量生理盐水作阴性对照, 35 $^{\circ}$ C 温育 48h, 观察溶血结果。ECP 对 O 型人红细胞及眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)、断斑石鲈 (*Pomadasys hasta*)、赤点石斑鱼和鸡等红细胞的溶血性测定如下: 用生理盐水在 96 孔微量反应板上对 ECP 作倍比稀释后, 加等量 1% O 型人红细胞及眼斑拟石首鱼、青鲈、石斑鱼和鸡红细胞, 37 $^{\circ}$ C 下作用 1h, 再置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 以使 50% 红细胞溶解的 ECP 最高稀释倍数为其溶血价。同时设立未加 ECP 孔作阴性对照。

1.6 胞外产物的毒性作用 小白鼠 LD₅₀的测定采用霍恩氏(Horn)法^[14]。以 10^{1/3}为剂量递增公比(即组距为 2.15 倍)设计两个注射剂量系列。系列一:每 20g 小鼠注射剂量分别为 0.1、0.215、0.464 和 1.0mL;系列二:每 20g 小鼠注射剂量分别为 0.0464、0.1、0.215 和 0.464mL。注射 0.5mL 无菌生理盐水作阴性对照。每个剂量用 5 只实验小白鼠。查表可测得 ECP 对小鼠的 LD₅₀。

根据改良寇氏法 (Kärber)^[14]测定 ECP 对石斑鱼的 LD₅₀。腹腔注射 ECP, 每 5g 石斑鱼注射剂量分别为 0.08、0.13、0.20、0.32、0.50、0.79 和 0.1mL。每个剂量注射 10 尾鱼。注射 0.5mL 无菌生理盐水作阴性对照。

1.7 胞外蛋白酶的检测 将溶藻弧菌接种于含10g/L 脱脂奶的琼脂平板,28℃ 培养 24h,凡菌落周围出现透明的溶蛋白圈者判为阳性。以生理盐水作阴性对照。

参照 Henry 等^[11]的方法略加改动。方法如下:将 0.5g 偶氮酪蛋白(Sigma 公司)溶于 100mL 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)中,取 100μL 偶氮酪蛋白和 100μL 不同稀释度的 ECP 混合,用 Tris-HCl 缓冲液稀释至 500μL,37℃ 温育 30min。加入 10%(w/v)的三氯乙酸 400μL 室温放置 30min 终止反应。12000r/min 离心

5min, 除去沉淀蛋白, 上清转移至另一离心管中, 加入 1000μL 0.525 mol/L NaOH 显色, 测定 OD_{442nm} 值。以每 30min 增加 0.01OD_{442nm} 为一个酶活性单位。

1.8 部分环境因子对溶藻弧菌 ECPase 活性的影响

温度对 ECPase 活性的影响 参照李焕荣等^[15]的方法,将 ECP 分别在 4、20、30、37、50、56、60、70、80、90 和 100 作用 30min,用偶氮酪蛋白作底物检测 ECP 的酶活性变化。

pH 对 ECPase 活性的影响 参照李焕荣等^[15]的方法,分别用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 2.2)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 11.0),配成 pH 分别为 2.6、3.0、4.0、5.0、6.0、6.6、7.0、7.6、8.0、9.0、10.0 和 10.6 的梯度缓冲液,分析 ECP 在不同 pH 下对偶氮酪蛋白作用,测定 ECPase 活力的变化。

将 50mmol/L EDTA 和 100mmol/L 苯甲基磺酰氟分别加入 ECP,室温下作用 30min 后,检测蛋白酶活性变化,空白对照为煮沸 5min 的 ECP。

2 结果

2.1 溶藻弧菌 ECP 生物学活性分析

2.1.1 溶藻弧菌 ECP 酶活性定性分析 ECP 具有酪蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和脂肪酶等 4 种酶活性(表 1)。淀粉酶的活性最高,酪蛋白酶、脂肪酶活性次之,卵磷脂酶活性较低,未检测出明胶酶及脲酶活性。

表1 溶藻弧菌 ECP 酶活性

ECP 来源	淀粉酶	酪蛋白酶	脂肪酶	卵磷脂酶	明胶酶	脲酶
Source of ECP	Amylase	Caseinase	Lipase	Lecithinase	Gelatinase	Urease
溶藻弧菌	+++	++	++	+	-	-

注: + + + —酶活性最高; + + —酶活性较高; + —酶活性较低;
- —无明显酶活性

2.1.2 ECP 的溶血性 ECP 对断斑石鲈的溶血价最高,达到 1 32,眼斑拟石首鱼次之(1 8),对赤点石斑鱼红细胞的溶血性较差(1 2),而不能溶解鸡、羊及 O 型人红细胞。

2.1.3 ECP对小白鼠LD₅₀的测定 两个系列实验周期均为14d,结果见表2和表3。

表2 ECP 剂量系列一

Tab. 2 Lethal test of ECP on white mice injected with series 1 dose ECP

[illegible]

续表

试验小白鼠数(只)			注射剂量(mL/ 20g)			小白鼠死亡数量(只) 及时间(h)										死亡数(只)
						4	6	8	10	12	14	16	18	20	24	
剂量 1	5	0.10	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2		
剂量 2	5	0.22	0	0	0	0	1	2	0	0	2	0	0	5		
剂量 3	5	0.46	0	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	5		
剂量 4	5	1.00	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5		

表 3 EPC 剂量系列二

Tab.3 Lethal test of ECP on white mice injected with series 2 dose ECP

试验小白鼠数(只)			注射剂量(mL/ 20g)			小白鼠死亡数量(只) 及时间(h)										死亡数(只)
						4	6	8	10	12	14	16	18	20	24	
对照组	5	0.50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
剂量 1	5	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
剂量 2	5	0.10	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2		
剂量 3	5	0.22	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	0	5		
剂量 4	5	0.46	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5		

根据霍恩氏(Horn)法^[14]查表得,ECP 对小白鼠的 LD₅₀ 为 1.08mL,其 95 % 的可信限为 0.74—1.57mL。换算为 ECP 中蛋白含量则 LD₅₀ 为 0.08 mg/g,可信限范围为 0.06—0.12mg/g。

2.1.4 ECP 对石斑鱼 LD₅₀的测定 赤点石斑鱼注射 ECP 后的死亡情况见表 4。根据表 4 数据,由

$LD_{50} = Xk - i (\sum p - 0.5)$ 和 95 %可信限 = $lgLD_{50} \pm 1.96\sigma$ 公式计算得 ECP 对石斑鱼的 LD₅₀及 95 %的可信限范围分别为 0.21mL/ 5g 和 0.08—0.34mL/ 5g,换算为 ECP 中蛋白含量后,LD₅₀及 95 %的可信限范围分别为 0.17mg/g 和 0.07—0.28mg/g。

表 4 赤点石斑鱼注射溶藻弧菌胞 ECP 后的死亡情况

Tab.4 The data on death of *E. akaara* after injection with *V. alginolyticus* ECP

组别	剂量		石斑鱼	死亡数	死亡率	存活率	p ×q
	mL/ 5g	lg	尾数(n)	(尾)	(p)	(q)	
1	0.08	- 1.1	10	2	0.2	0.8	0.16
2	0.13	- 0.9	10	4	0.4	0.6	0.24
3	0.20	- 0.7	10	5	0.5	0.5	0.25
4	0.32	- 0.5	10	6	0.6	0.4	0.24
5	0.50	- 0.3	10	7	0.7	0.3	0.21
6	0.79	- 0.1	10	10	1.0	0.0	0.00
7	0.1	- 1.0	10	0	0.0	1.0	0.00
i = 0.2							$\sum p = 3.4$

2.2 胞外产物的理化特性

2.2.1 温度对 ECPase 活性的影响 见图 1。溶藻弧菌 ECPase 对热稳定性较差,当温度从 4 升至

50 ,蛋白酶活性逐渐升高,50 时达到最高值,之后酶活性急剧下降,70 时酶活性极低,到了 80 时酶活性完全丧失。

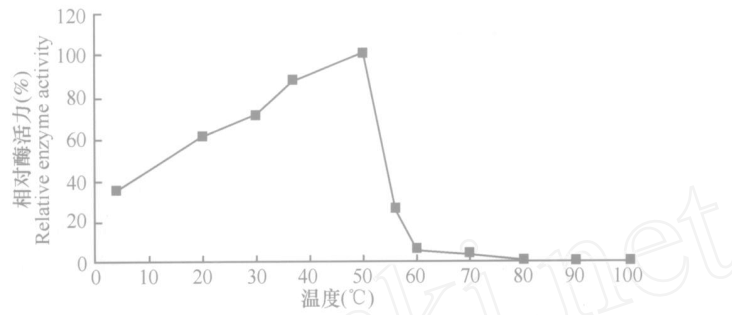


图 1 温度对 ECPase 活力的影响

Fig. 1 Effect of temperature on ECPase activity

2.2.2 pH对 ECPase 活性的影响 见图 2。从图 2 可知,ECPase 的活性随着 pH 值的增加而增强,到 pH 8.0 时,酶活性最高,并且在 pH 10.6 时酶活性仍维持较高水平。

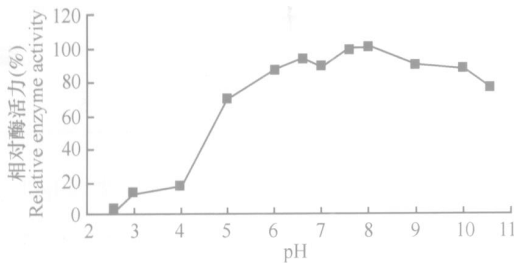


图 2 pH 对 ECPase 活力的影响

Fig. 2 Effect of pH values on ECPase activity

2.2.3 蛋白酶抑制实验 50mmol/L EDTA 和 100mmol/L 苯甲基磺酰氟能分别使 ECPase 的活力下降 83.40 %和 51.32 %。

3 讨论

权太淑等^[16]从腹泻病人分离的溶藻弧菌 ECP 中检测到与副溶血弧菌相似的耐热溶血素,林业杰等^[17]也报道人源溶藻弧菌菌株能产生 ST 和 LT 肠毒素。但国内外对鱼源溶藻弧菌外毒素(包括溶血素、细胞溶素和肠毒素)的报道较少,未曾进行溶血谱实验。本文结果表明鱼源溶藻弧菌 ECP 对断斑石鲈、眼斑拟石首鱼及赤点石斑鱼的红细胞有溶血作用,溶血价分别为 1 32、1 8 和 1 2,但不能溶解鸡、羊及人 O 型红细胞,因而认为鱼源溶藻弧菌 ECP 中含有溶血素,且这种溶血素只对低等脊椎动物如鱼有溶血性,而对高等脊椎动物无溶血性。但许兵等^[9]发现虾源溶藻弧菌 ECP 能溶解羊红细胞,与本文结果存在差异。此外,从鱼源溶藻弧菌 ECP 中测出酪蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和脂肪酶等 4 种酶

活性,这与许兵等^[9]及张朝霞^[17]等的研究结果一致,他们发现 ECP 中蛋白酶活性最高,而作者测得淀粉酶活性最高。这些结果的差异表明不同来源的溶藻弧菌菌株存在不同的血清型,致病对象不同,因而 ECP 的溶血谱和产酶能力存在差异。

Lee 等^[8]报道溶藻弧菌能产生多种碱性丝氨酸蛋白酶类,且 Lee 等^[19,20]和 Chen 等^[21]从虾源溶藻弧菌 ECP 中纯化到分子量为 33kD 的蛋白酶,此酶为 SDS 抗性的碱性丝氨酸蛋白酶,而非金属蛋白酶。本文提取的鱼源溶藻弧菌 ECP 中也存在碱性蛋白酶,而且属于金属蛋白酶类。因为其最适 pH8.0,且在碱性(pH10.6)条件下酶活性较高。而金属螯合剂 EDTA 和苯甲基磺酰氟能使 ECPase 活性显著下降(分别下降 83.40 %和 51.32 %),可见 ECPase 的生物学作用需要金属离子的参与。Liu 等^[5]报道来源于鲍鱼的溶藻弧菌 H-11 株的 ECP 对幼鲍的半数致死量 LD₅₀为 2.96mg/g。Lee 等^[6]报道来源于鲈鱼苗的溶藻弧菌 ECP 对鲈鱼的致死剂量为 0.52mg/g。而本文提取的鱼源溶藻弧菌 ECP 对小白鼠和石斑鱼的 LD₅₀ 分别为 0.08mg/g 和 0.17mg/g,表明提取的鱼源溶藻弧菌 ECP 对实验鱼的毒性或致病性比 Lee 等^[6]和 Liu 等^[5]分离的溶藻弧菌 ECP 高,这也说明来源不同的溶藻弧菌致病性是不相同的。

此外,作者还探讨了部分环境因子对 ECPase 活性的影响。ECPase 在 50 °C 时达到最高值,70 °C 时酶活性极低,到了 80 °C 时酶活性完全丧失,因而认为鱼源溶藻弧菌 ECPase 是热稳定性较差的蛋白酶类。

参考文献:

- [1] Nie Z X, Zhong J R, Zhang G R, et al. An investigation report of food poisoning caused by *Vibrios alginolyticus* [J]. Chin. J of P H M, 1994, 10(3) :142 [聂忠学,钟嘉荣,张谷若,等. 溶藻弧菌

- 食物中毒的调查报告. 中国公共卫生, 1994, 10(3): 142]
- [2] Chen Y, Liu S Z, Yi H. One food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus* and *Vibrios parahaemolyticus* [J]. *Academic Journal of Guangdong College of Pharmacy*, 1999, 15(2): 159—160 [陈抒, 刘守芝, 易鸿. 一起由副溶血弧菌和溶藻弧菌引发的食物中毒. 广东药学院学报, 1999, 15(2): 159—160]
- [3] Lee K K, Yu S R, Yang T L, et al. Isolation and characterization of *Vibrio alginolyticus* from diseased kuruma prawn, *penaeus japonicus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*. 1996, 22: 111—114.
- [4] Zheng G X, Li H, Huang L Y, et al. Separation and character of pathogenic bacteria (*Vibrios alginolyticus*) from ill *Meretrix meretrix* Linnaeus and observing its tissues [J]. *J Fish China*, 1991, 15(2): 93—95 [郑国兴, 李何, 黄宇宇, 等. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 1991, 15(2): 93—95]
- [5] Liu P C, Chen Y C, Lee K K. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. *Microbios*, 2001, 104(408): 71—77
- [6] Lee K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider [J]. *Microb Pathog.*, 1995, 19(1): 39—48
- [7] Hare P, Scott-Burden T, Woods D R. Characterization of extracellular alkaline protease and collagenase induction in *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129: 1141—1147
- [8] Lee K K, Yu S R, Lin P C. Alkaline serine protease is a exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in kuruma prawn, *Penaeus japonicus* [J]. *Current Microbiology.*, 1997, 34(2): 110—117
- [9] Xu B, Ji S W, Xu H S, et al. Study on pathogenic bacteria and its pathogenesis of *Penaeus Chinensis* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1993, 15(1): 98—106 [许兵, 纪尚伟, 徐怀恕, 等. 中国对虾病原菌及其致病性研究. 海洋学报, 1993, 15(1): 98—106]
- [10] Diao Y X, Jia S Y, Li J Q, et al. Isolation and properties of *Clostridium Colinum* exotoxin [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1999, 21(4): 253—255 [刁有祥, 贾世玉, 李久芹, 等. 鸭梭状芽胞杆菌外毒素的分离与特性研究. 中国预防兽医学报, 1999, 21(4): 253—255]
- [11] Henry Y, Windle J, Dermot K, et al. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacteria pylori* [J]. *Infect. Immu*, 1997, 65(8): 3132—3137
- [12] Carmen Balebona M. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured Gilt-head Sea Bream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 11: 4269—4275
- [13] Ichige A, Oishi K, Mizushima S, et al. Isolation and characterization of mutant of a marine vibrio strain that are defective in production of extracellular proteins [J]. *Bacterio*, 1998, 170: 3537—3542
- [14] Zhang X, Liu Y G. Toxicology [M]. Beijing: Beijing Medical University and China Xiehe Medical University press, 2001 [张铤, 刘毓谷. 毒理学. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 2001]
- [15] Li H Y, Chen H Q, Lu C P, et al. Purification and character of extracellular proteinase of *Aeromonas Hydrophile* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1996, 19(3): 88—94 [李焕荣, 陈怀青, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase 54 的纯化及特性分析. 南京农业大学学报, 1996, 19(3): 88—94]
- [16] Quan T S, Li W, Yang X L. Study on separation and pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* from diarrhetic patient [J]. *Chin. J of P H M*, 1985, 4(5): 15—18 [权太淑, 李薇, 杨喜玲. 自腹泻患者中分离溶藻弧菌及其病原性的探讨. 中国公共卫生, 1985, 4(5): 15—18]
- [17] Lin Y J, Ou J M, Dong X P, et al. Study on pathology of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Strait J Prev Med*, 2001, 7(1): 45—46 [林业杰, 欧剑鸣, 董新平, 等. 溶藻弧菌的病原学研究. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(1): 45—46]
- [18] Zhang Z X, Wang J, Su Y Q, et al. Studies on pathogenesis of extracellular products from pathogenetic bacteria in *Penaeus monodon* Fabricius [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2000, 5(22): 94—101 [张朝霞, 王军, 苏永全, 等. 斑节对虾病原菌胞外产物的致病性研究. 海洋学报, 2000, 5(22): 94—101]
- [19] Lee K K, Chen F R, Yu S R, et al. Effects of extracellular products of *Vibrio alginolyticus* penaeid prawn plasma components [J]. *Lett Appl Microbiol.*, 1997, 25(2): 98—100
- [20] Chen F R, Liu P C, Lee K K. An evaluation of chromogenic substrates for characterization of serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus* [J]. *Microbios.*, 1999, 98(389): 27—34
- [21] Chen F R, Liu P C, Lee K K. Lethal attribute of serine protease secreted by *Vibrio alginolyticus* strains in kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Z Naturforsch*, 2000, 55(1-2): 94—99

CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR PRODUCTS FROM *VIBRIO ALGINOLYTICUS* ISOLATED FROM MARICULTURED FISH

ZUO Feng-Qin, JIAN Ji-Chang and WU Zao-He

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* is an opportunist pathogen, which exists extensively in seawater, and causes diarrhea in human and vibriosis in maricultured animals. Fewer studies on the extracellular product (ECP) of *V. alginolyticus* were reported. In our experiments the ECP was extracted from *V. alginolyticus* and the biological and physicochemical characters of the ECP were assessed. After *V. alginolyticus* had grown on tryptic soy agar (TSA) supplemented with 2 %NaCl for 48h, the bacteria on the Petri dish were washed away by PBS, and the bacteria suspension was centrifuged at 10000 r/min at 4 °C, then the supernatant was filtered through 0.22μm filter to obtain the extracellular products (ECP). The results showed that the ECP of *V. alginolyticus* has amylase, casease, lecithinase and lipase activities, which the amylase activity was highest, casease and lipase activities secondly, and lecithinase lowest, but has no gelatinase and urase activities. The ECP could dissolve the erythrocytes of lined silver grouper (*Pomadasys hasta*), red drum (*Sciaenops ocellatus*) and redspotted grouper (*Epinephelus akaara*), but not do the erythrocytes of chicken, sheep and O-type blood human. The LD₅₀ value of ECP on mice and *E. akaara* were 0.08 mg/g and 0.17 mg/g respectively, the 95 % credibility ranges were 0.06—0.12mg/g and 0.07—0.28mg/g respectively. 50mmol/L ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) and 100mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) could reduce extracellular proteinase (ECPase) activities of *V. alginolyticus* by 83.40 % and 51.32 % separately. The ECPase activities gradually rose with the increase of temperature from 4 °C to 50 °C, and highest at 50 °C, then dropped suddenly. The ECPase activities were gradually raised also with the enhancement of pH value, and highest at pH8.0, moreover higher at pH10.6. Thus the ECPase has bad thermostability, and the optimal temperature and pH value of the ECPase is 50 °C and pH8.0 respectively.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; Extracellular product; Character