

哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)ML01株胞外产物及分泌性蛋白的分离与特性分析*

沈桂明^{1,2} 李晨¹ 史成银^{1①} 贾丹^{1,2}
范超^{1,2} 谢国驹¹ 付泉洁^{1,3}

(1. 农业部海水养殖病害防治重点实验室 青岛市海水养殖流行病学与生物安保重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

摘要 本研究以引起珍珠龙胆石斑鱼 [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂)] 幼鱼“皮肤溃疡病”的哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) ML01 株为研究对象, 采用平板膜覆盖技术和柱层析技术, 分离、纯化了 ML01 株的胞外产物及分泌性蛋白。应用毒性试验、质谱分析与分子克隆技术, 对纯化的胞外产物和 3 种主要的分泌性蛋白进行了特性分析与鉴定。结果显示, 哈维氏弧菌 ML01 株的胞外产物 (Extracellular products, ECPs) 具有酯酶、明胶酶、淀粉酶、酪蛋白酶活性, 无脲酶活性。ECPs 对羊红细胞无溶血性, 对斑马鱼 (*Danio rerio*) 的半数致死剂量 (LD₅₀) 为 19.55 μg/g 鱼体重。从 ML01 株中分离到 3 种主要的分泌蛋白 P42、P36、P31, 其分子量分别为 42、36、31 kDa。经质谱鉴定和分析, 这 3 种蛋白分别为哈维氏弧菌的外膜蛋白 OmpU 和 OmpN, 以及一种功能未知的蛋白。利用同源克隆, 成功地从 ML01 株基因组中扩增到了 P42、P36、P31 的基因。序列测定和比对结果显示, ML01 株的这 3 个基因与哈维氏弧菌 ATCC 33843 (GenBank CP009467) 的相应基因相比, 其开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 序列的相似性分别为 97.08%、100%、99.67%, 其编码的多肽序列的相似性分别为 99.71%、100% 和 99.93%。本研究对进一步分析哈维氏弧菌 ML01 株的致病机理、研发该菌的亚单位疫苗具有重要的参考价值。

关键词 哈维氏弧菌; 胞外产物; 分泌性蛋白; 质谱分析; 基因克隆

中图分类号 S941 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)04-0025-09

珍珠龙胆石斑鱼 [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂)] 是褐点石斑鱼 (♀) 和龙胆石斑鱼 (♂) 的杂交后代, 是高价值的水产养殖鱼类新品种。近两年其幼苗因“皮肤溃疡病”而大规模死亡, 经济损失巨大。经鉴定, 该病的病原为哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*), 命名为哈维氏弧菌 ML01 株 (Shen *et al.*, 2017)。哈维氏弧菌是一种海洋发光革兰氏阴性

杆菌, 是海水养殖动物的主要病原菌之一。在亚洲、欧洲、北美洲等地陆续有哈维氏弧菌导致虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*)、豹纹鳃棘鲈 (*Plectropomus leopardus*)、斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 等多种水产养殖动物发病死亡报道, 造成了巨大的经济损失 (Zhang *et al.*, 2000, 2001; Won *et al.*,

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2016HY-ZD0505; 2017HY-ZD0303) 资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2016HY-ZD0505; 2017HY-ZD0303)]. 沈桂明, E-mail: gmshen1989@126.com

① 通讯作者: 史成银, 研究员, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2016-03-25, 收修改稿日期: 2016-04-17

2006; 陈政强等, 2012; 王雪惠等, 2012; 徐晓丽等, 2014)。

哈维氏弧菌的致病因子是近年来的研究热点之一。研究表明, 哈维氏弧菌主要的致病因子包括胞外产物(Extracellular products, ECPs)、外膜蛋白(Outer membrane proteins, Omps)、鞭毛丝蛋白等几大类(李洋等, 2014)。其中, ECPs 的成分较为复杂, 已报道的有多种胞外蛋白酶(Teo *et al*, 2003a、b; 陈雅芳等, 2006)和溶血素(Zhang *et al*, 2001)。胞外蛋白酶是最早确定的哈维氏弧菌致病因子之一, Liu 等(1997)率先自病原性的哈维氏弧菌中鉴定出半胱氨酸蛋白酶, 此后, Lee 等(1999)、沈锦玉等(2011)也分离纯化出哈维氏弧菌半胱氨酸蛋白酶, 并发现该酶具有较强的抗凝血性和毒性。在哈维氏弧菌的外膜蛋白研究方面, 目前已在多个菌株中鉴定出 OmpU、OmpK、OmpW 等几种外膜蛋白, 这些外膜蛋白具有良好的免疫原性, 可用于哈维氏弧菌亚单位疫苗的研发(黄辉等, 2010; 何超军等, 2011; 张崇文等, 2006; 黄浦江等, 2013)。

鉴于哈维氏弧菌对海水养殖生物的巨大危害, 本研究以珍珠龙胆石斑鱼幼鱼“皮肤溃疡病”病原——哈维氏弧菌 ML01 株为研究对象, 对其胞外产物和分泌性蛋白进行了分离和特性分析, 为该菌的致病性研究和防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

健康斑马鱼(*Danio rerio*)购自山东省青岛市某观赏鱼市场, 平均全长为 3.65 cm, 平均体重为 0.38 g。在中国水产科学研究院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室循环水养殖系统中暂养 7 d, 确认健康后用于毒性实验。

1.2 菌株

珍珠龙胆石斑鱼“皮肤溃疡病”病原菌——哈维氏弧菌 ML01 株, 于 2014 年夏季分离自山东某养殖场患病石斑鱼幼鱼。感染该菌株的石斑鱼幼鱼(体长为 1–6 cm)表现出皮肤溃疡、体表出血等症状。如不及时治疗, 死亡率高达 90%。毒力实验表明, ML01 株对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的 LD₅₀ 为 2.65×10^4 CFU/g 鱼体重。该菌株已保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(保藏号: CGMCC No. 11720)。

1.3 ECPs 的提取及总蛋白含量的测定

ECPs 的提取参照 Inamura 等(1984)的方法, 采用平板玻璃纸覆盖技术进行。具体操作为挑取 ML01 单

菌落, 接种于含 1.5% NaCl 的胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TNB)中, 摇菌 24 h 后取 0.2 ml 均匀涂布于表面覆盖灭菌玻璃纸的含 1.5% NaCl 的胰蛋白胨大豆琼脂(TNA)平板上, 置于 28℃ 培养 24 h。用 1 ml 无菌 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)悬浮玻璃纸上的细菌及其分泌物, 并将其收集到 1.5 ml 离心管中, 在 4℃ 下 14000 × g 离心 20 min, 取上清液, 用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 收集滤出液, 即为 ECPs 粗提液。

取少量粗提液用 Pierce[®] BCA Protein Assay Kit(Thermo)测定其蛋白含量, 其余粗提液分装, 保存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.4 ECPs 的酶活性及溶血性分析

对收集的 ECPs 粗提液, 参照沈锦玉等(2011)的方法进行 ECPs 酶活性实验。具体方法是: 分别配制含 1%明胶、1%酪蛋白、1%淀粉、1%吐温 20、2%脲素(加 0.0015%酚红)的琼脂平板, 用打孔器在平板上无菌打孔, 每孔加入 30 μl ECPs 粗提液, 28℃ 温育 12 h, 然后在明胶平板中加入酸性氯化汞, 在酪蛋白平板中加入 10%的三氯乙酸(TCA), 在淀粉平板中加入卢戈氏碘液, 观察孔周围透明圈情况, 有透明圈即判断为酶活性阳性。

采用脱纤维绵羊血平板, 用打孔器在平板上无菌打孔, 每孔加入 30 μl ECPs 粗提液, 28℃ 温育 12 h, 观察孔周围透明圈情况, 有透明圈即判断为溶血性阳性。

1.5 ECPs 的毒性分析

取健康的斑马鱼 96 尾, 随机分为 12 组, 每组 8 尾鱼。设置 3 个实验组和 1 个对照组, 每组 3 个平行。将 ECPs 粗提液用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)稀释。对 3 个实验组的斑马鱼分别腹腔注射 20 μl 总蛋白浓度分别为 1027.84 μg/ml、513.92 μg/ml 和 342.61 μg/ml 的 ECPs 粗提液, 对照组的斑马鱼注射 20 μl 的 PBS。

实验期间, 各组斑马鱼饲养于含 4 L 自来水的水族箱中, 水温为 25℃, 每天换水 50%, 投喂 3 次, 每次 0.04 g/尾。每天观察斑马鱼状态, 记录死亡情况, 持续 7 d。采用 Reed-Muench 法计算半数致死剂量(LD₅₀)。

1.6 哈维氏弧菌分泌性蛋白的分离及纯化

挑取 ML01 单菌落接种至适量的 TNB 液体培养基中, 28℃ 摇菌 24 h 后, 在 4℃ 下 2500 × g 离心 15 min, 取上清液, 经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 收集滤出液。取 50 ml 滤出液, 在缓慢搅动下加入 (NH₄)₂SO₄ 固体, 使之达到 80% 的饱和度, 并连续搅拌 1 h, 然后在 4℃ 下 9900 × g 离心 15 min, 弃去上清液。沉淀部分

加 0.01 mol/L PBS(pH 7.0)溶解, 并透析 36 h。最后用聚乙二醇(PEG 2000)浓缩, 即为分泌性蛋白粗提液。

参照魏玉西等(2002)的方法对上述分泌蛋白粗提液进行 Sephadex G-100 凝胶柱层析, 去除溶液中的无机盐和小分子杂蛋白, 收集 4–150 kDa 范围内的纯化蛋白。

1.7 分泌性蛋白的 SDS-PAGE 及主要区带的质谱分析

取 1.6 中纯化出的分泌性蛋白进行 SDS-PAGE 分析。具体参数是: 5%的浓缩胶, 15%的分离胶, 每孔上样 10 μ l; 起始电压为 70 V, 待样品进入分离胶后恒压 120 V, 电泳完毕后经考马斯亮蓝 R-250 染色。从凝胶上切下相对含量高的蛋白条带 P42、P36、P31, 送上海博苑科技有限公司进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。通过 MATRIX SCIENCE 在线比对鉴定, 得到与 P42、P36、P31 最匹配的蛋白 GenBank 检索号。

1.8 分泌性蛋白编码基因的克隆、测序与比对

通过 1.7 中得到的蛋白检索号, 在 GenBank 上获得相应的蛋白序列, 然后在 NCBI 网页上(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)用 Tblastn 在线程序搜寻编码这些蛋白的基因序列, 并在哈维氏弧菌 ATCC 33843 株基因组(GenBank 检索号 CP009467 和 CP009468)上定位。然后用 Primer premier 5.0 设计 PCR 引物, 从哈维氏弧菌 ML01 株的基因组中扩增相应的基因, 引物由上海生工生物工程公司有限公司合成(表 1)。

表 1 本研究所用的引物
Tab.1 Primers used in this study

引物名称 Names	引物序列 Sequence (5'-3')	产物大小 Product size(bp)
p42-F	AATACCACGCCATCAATCG	1596
p42-R	TGGTGGGGATAAGCAAAG	
p36-F	CGACAAGGCAAGAACCACAG	1185
p36-R	CGCACATTGGTGGAGAAGAT	
p31-F	TCCTTACGAAACTCGCATCT	1089
p31-R	GACATTCAAATAACGGCTCG	

挑取哈维氏弧菌 ML01 株的单菌落, 接种于 5 ml 新鲜的 2216E 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇菌 12 h, 然后用 TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, 中国)提取细菌基因组 DNA, 具体操作按厂家说明书进行。25 μ l 的 PCR 反应体系包含: Ex Taq DNA (TaKaRa) 聚合酶预混物 12.5 μ l, 正反向引物(10 μ M)各 1 μ l, 模板 DNA 1 μ l, ddH₂O 9.5 μ l。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,

95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 适当温度退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 温育 7 min。其中, p42 基因退火温度为 56 $^{\circ}$ C, p36 基因退火温度为 57 $^{\circ}$ C, p31 基因退火温度为 55 $^{\circ}$ C。PCR 产物送至上海生工生物工程公司测序。

对上述测得的哈维氏弧菌 ML01 株 P42、P36、P31 蛋白的基因序列, 取其开放阅读框(Open reading frame, ORF)序列及推测的氨基酸序列, 与哈维氏弧菌 ATCC 33843 株的相应序列分析比对。

2 结果

2.1 ECPs 的酶活性及溶血性

采用平板玻璃纸覆盖技术收集 24 h 的 ECPs, 参照 Pierce[®] BCA Protein Assay Kit(Thermo)的方法测定出其蛋白含量为 1027.84 μ g/ml。酶活性测定结果表明, 哈维氏弧菌 ML01 株的 ECPs 具有酯酶、明胶酶、淀粉酶以及酪蛋白酶活性, 不具有脲酶活性, 对绵羊红细胞无溶血性。

2.2 ECPs 对斑马鱼的毒性

用哈维氏弧菌 ML01 株的 ECPs 粗提液腹腔注射健康的斑马鱼, 注射 6 h 后实验鱼开始出现死亡。注射后 7 d 内, 1027.84 μ g/ml 浓度的 ECPs 注射组累积死亡率为 95.83%, 513.92 μ g/ml 浓度的 ECPs 注射组累积死亡率为 66.67%, 342.61 μ g/ml 浓度的 ECPs 注射组累积死亡率为 45.83%, 而 PBS 对照组无死亡情况出现(图 1)。但除了注射部位略微变红外, 实验鱼并无其他明显症状。按照 Reed-Muench 法计算出 ML01 株 ECPs 粗提液对斑马鱼的 LD₅₀ 为 19.55 μ g/g 鱼体重。

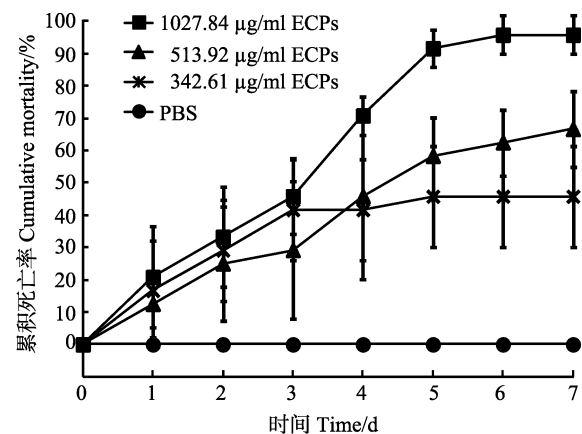


图 1 哈维氏弧菌 ML01 株的 ECPs 粗提液对斑马鱼的毒性
Fig.1 The toxicity of crude ECPs of isolate ML01 to zebra fish

2.3 哈维氏弧菌分泌性蛋白的纯化及 SDS-PAGE 分析

哈维氏弧菌 ML01 株的分泌性蛋白粗提液经 Sephadex G-100 凝胶柱层析后, 得到单一的洗脱峰。收集对应洗脱峰的蛋白溶液, 取 1 ml 进行 SDS-PAGE 染色, 可以观察到 6 条清晰的蛋白条带。其中, 3 个主要蛋白条带的分子量约为 42、36、31 kDa, 分别记为 P42、P36、P31 蛋白(图 2)。

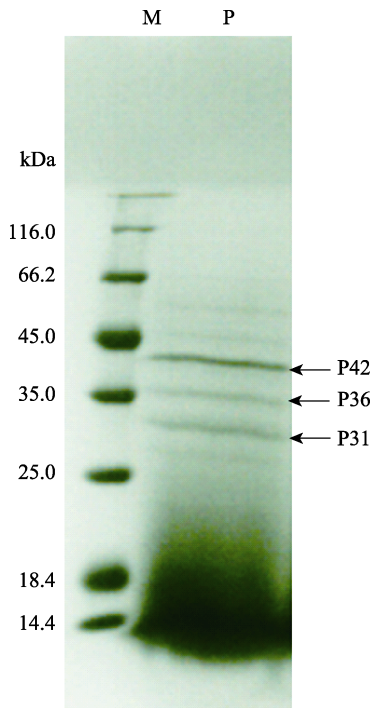


图 2 菌株 ML01 分泌性蛋白的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE profiles of purified secretory proteins of isolate ML01

泳道 M: Marker; 泳道 P: Sephadex G-100 纯化的 ML01 株分泌蛋白

Lane M: Protein marker; Lane P: Purified secretory proteins of isolate ML01 by Sephadex G-100

2.4 主要分泌性蛋白条带的质谱分析

从 SDS-PAGE 凝胶上切下 P42、P36、P31 蛋白条带, 进行 MALDI-TOF/TOF 质谱分析。经过 MATRIX SCIENCE 在线比对显示, P42 蛋白的肽指纹图谱与哈维氏弧菌外膜蛋白 U(OmpU) 的匹配度最高, 有 16 条序列相匹配, 序列覆盖率约为 15%, 即 P42 可以鉴定为 ML01 株的外膜蛋白 U。P36 蛋白的肽指纹图谱与哈维氏弧菌外膜蛋白 N(OmpN) 的匹配度最高, 有 15 条序列相匹配, 序列覆盖率约为 15%, 即 P36 可以鉴定为 ML01 株的外膜蛋白 N。P31 蛋白的肽指纹图谱与哈维氏弧菌一种功能未知蛋白的匹配度最高, 有 14 条序列相匹配, 序列覆盖率约为 14%, 即 P31 为 ML01 株的一种功能未知的蛋白(图 3-图 5)。

2.5 ML01 株分泌性蛋白编码基因的克隆、测序与比对

应用本研究设计的引物, 通过同源克隆的方法, 从哈维氏弧菌 ML01 株的基因组中成功地扩增出了 P42、P36 和 P31 蛋白的基因, 即 *OmpU*、*OmpN* 和 *p31*。其中, *OmpU* 的 ORF 长度为 1026 bp, 编码 341 个氨基酸; *OmpN* 的 ORF 长度为 1029 bp, 编码 342 个氨基酸; *p31* 的 ORF 长度为 900 bp, 编码 299 个氨基酸(图 6-图 8)。取 ML01 株各基因的 ORF 序列及推测的氨基酸序列, 与哈维氏弧菌 ATCC 33843 株的相应序列进行比对分析, 结果显示, 2 株菌 *OmpU* 基因的 ORF 序列相似度为 97.08%, 氨基酸序列相似度为 99.71%; *OmpN* 基因的 ORF 序列相似度为 100%, 氨基酸序列相似度也为 100%; *p31* 基因的 ORF 序列相似度为 99.67%, 氨基酸序列相似度为 99.93%。

3 讨论

2014 年夏季, 本实验室首次从患病的珍珠龙胆

```

1 MKKTLIALSV SAAAMATGVN AAELYNQDGT SLEMGGRAEA RLSMKDGDVA
51 DNSRIRLNFL GTQAINONLY GVGFWEGEFT TNEQGGVDS VNKDSSNLDT
101 RYAYAGLGG FGEVTYKND GALGVITDFT DIMAYAGNSA ADKLAADR
151 DNMLSYKGQF ENLAVKASYR FADRVENKAG TEYTDNGEDG YLSAIYTLG
201 DTGLDLGAGY ADQSDANEYM LAASYTMNDL YFAGLFTDGE KEATFKKTV
251 YTGVELAGAY TLGQTVFTTT YNNAETNNET SANNFAVDAP YYFKPNFRGY
301 VSYNFNLIDA GDAMGSTTSA NYKATKIDSE DELALGLRYD F

```

图 3 哈维氏弧菌外膜蛋白 U 的序列(gi|829488389)

Fig.3 The OmpU sequence of *V. harveyi* (gi|829488389)

质谱鉴定得到的 ML01 株 P42 蛋白的肽段用下划线表示

The underlined sequences were peptides from protein P42 of strain ML01 identified by mass spectrometry analysis

1 MNKKFLAAAI AAATFGTQAV AVELYNNDGT TFSVGGHVISI NVNGSEQGDT
 51 DVGTNSPRIN FTATQDLGNG FTADARGEWA LNYLDGGDET FTTRLGYLGL
 101 THDVYGRAVG GTQWAPYYDV AGVADMPIAF ANDFIYDDHG NLGTGRADKM
 151 LSYRNAIELG EAGAINFGLG WQGSQTDADT SLNYDDRVQA ALSYQIMGAK
 201 IGYTYTGGDI KDGVSKESAE SHLVSAAYGS YGQGLYIAAV YGSNENMNFS
 251 TTGDRLVDS D AYEALLAYAL PSSLNLSINY EMVEGKTFKN SKTETAREEM
 301 AVQAEYNFTP KFVGYAGYQF DLNDANDRKT DDKWALGARY YL

图 4 哈维氏弧菌外膜蛋白 N 的序列(gi|49594841)

Fig.4 The OmpN sequence of *V. harveyi* (gi|49594841)

质谱鉴定得到的 ML01 株 P36 蛋白的肽段用下划线表示

The underlined sequences were peptides from protein P36 of strain ML01 identified by mass spectrometry analysis

1 MLKKMTLLTA ATIALLYCGCG GGSSSGSTSE SKGQSSFDY PIQNSSFKPE
 51 ASTKLHYVTS ADGQQGEPIT ISFEPMAVQK LIDRLRDTQQ DDPFIPVIQL
 101 LENNGITQFY LDNSEQEGNT YFAGIDGAL HEVTDLYLID SLSNVMMMS
 151 SPLFRLEGST VKEKDPNIDI SKHLVSVIVD LSGEQVKRML DSFDDNPWWN
 201 ALADNAQCKT TWSQQVGETG ARKTFNVSGK SVEAAYLTEK NTYNLVCDGM
 251 ELIDSKEFES SAERWFNPTL GFIEQVELLK SEQIQVRETK VTLNKIEKA

图 5 哈维氏弧菌一种未知功能蛋白的序列(gi|915938619)

Fig.5 The hypothetical protein sequence of *V. harveyi* (gi|915938619)

质谱鉴定得到的 ML01 株 P31 蛋白的肽段用下划线表示

The underlined sequences were peptides from protein P31 of strain ML01 identified by mass spectrometry analysis

1 CACTGTTTCATTACACTAAAAACATCAAAAAGATAAAAAACAATCAATGTCAGACCAATGTCAGGCAAGATATAATCATTTAAAAACAACACTTTAAGAT
 101 GAAATAACAACCAATTGAACAGTGTTCATTAGTTGGATTTATATCATTTTACTAACTCATAAGGAACTTTAGCAGTAAAAACATGTCGGCAAGTTATTT
 201 CGTTATGGCTTTTTCAGAGTGTGGGCAATTTGCCGCGAATGAAACTATACGAACAACAATAGCTTTGTGAGAGATAACCTCTCCCCCATAAAAACATGATTAT
 301GGACAGCTAACTAGGACAAAATAAG ATG AAA AAG ACT CTA ATT GCT CTT TCT GTA TCT GCA GCA GCT ATG GCA ACT GGC GTT AAC
 M K K T L I A L S V S A A A M A T G V N
 385 GCA GCT GAA CTT TAC AAC CAA GAC GGC ACT TCT CTA GAA ATG GGC GGT CGT GCT GAA GCA CGT CTA TCT ATG AAA GAT
 A A E L Y N Q D G T S L E M G G R A E A R L S M K D
 463 GGC GAC GTA GCG GAC AAC TCT CGT ATC CGT CTA AAC TTC CTT GGC ACA CAA GCA ATC AAC GAC AAC CTA TAC GGT GTT
 G D V A D N S R I R L N F L G T Q A I N D N L Y G V
 541 GGT TTC TGG GAA GGT GAA TTC ACT ACT AAC GAA CAA GGT GGT GTT GAT AGC GAC GTA AAT AAA GAC AGC AGT AAC CTT
 G F W E G E F T T N E Q G G V D S D V N K D S S N L
 619 GAC ACT CGT TAC GCA TAC GCT GGT CTA GGC GGT GCA TTC GGT GAA GTT ACT TAC GGT AAA AAC GAC GGT GCG CTA GGC
 D T R Y A Y A G L G G A F G E V T Y G K N D G A L G
 697 GTT ATC ACT GAC TTC ACA GAT ATC ATG GCG TAC GCT GGT AAC TCT GCT GCT GAC AAA CTA GCT GCA GCT GAC CGT TCA
 V I T D I M A Y A G N S A A D K L A A A D R S
 775 GAC AAC ATG CTG TCT TAC AAA GGT CAA TTC GAA AAC CTA GCA GTT AAA GCT AGC TAC CGT TTC GCT GAC GCG GTA GAA
 D N M L S Y K G Q F E N L A V K A S Y R F A D R V E
 853 AAC AAA GCT GGT ACT GAA TAC ACT GAT AAC GGC GAA GAT GGC TAC TCT CTA TCT GCT ATC TAC ACT CTA GGC GAC ACT
 N K A G T E Y T D N G E D G Y S L S A I Y T L G D T
 931 GGT CTT GAC CTA GGT GCT GGT TAC GCG GAC CAA TCT GAC GCT AAC GAA TAC ATG CTT GCT GCT TCT TAC ACA ATG AAC
 G L D L G A G Y A D Q S D A N E Y M L A A S Y T M N
 1009 GAC CTA TAC TTT GCA GGT CTA TTC ACT GAC GGT GAA AAA GAA GCA ACA TTC AAG AAA ACT GTA GAT TAC ACT GGT TAC
 D L Y F A G L F T D G E K E A T F K K T V D Y T G Y
 1087 GAA CTA GCA GGT GCT TAC ACT CTA GGT CAA ACA GTG TTC ACA ACG ACG TAC AAC AAC GCA GAA ACT AAC AAC GAA ACT
 E L A G A Y T L G Q T V F T T T Y N N A E T N N E T
 1165 TCT GCA AAC AAC TTC GCA GTT GAC GCG TCT TAC TAC TTC AAG CCT AAC TTC CGT GGT TAC GTA TCG TAC AAC TTC AAC
 S A N N F A V D A S Y Y F K P N F R G Y V S Y N F N
 1243 CTA ATT GAT GCT GGC GAT GCT ATG GGC TCA ACG ACT TCT GCT AAC TAC AAA GCA ACG AAG ATC GAT TCT GAA GAC GAG
 L I D A M G S T T S A N Y K A T K I D S E D E
 1321 CTA GCT CTA GGT CTA CGT TAC GAC TTC TAA TTCAGTCTACGACTTGAAGATAAAATGCTCGCTTATGCGGGCATTTTTATATCCAGAATT
 L A L G L R Y D F *
 1414 TGCGATTTTTGCGTATATACTCAATTGCATAACTAACCTCAGAACTATTACTAGCGCTTACG

图 6 ML01 株 *OmpU* 基因的核酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.6 The nucleotide sequence and predicted amino acids sequence of *OmpU* from strain ML01

```

1  ATAACCTAATGAATAAATAC ATG GAT TTT ATA ATG AAC AAA AAA TTC CTA GCA GCA GCG ATC GCA GCA GCA ACA TTC GGT ACA
   M N K K F L A A A I A A A T F G T
83  CAA GCA GTA GCA GTG GAG CTT TAC AAC AAC GAT GGC ACA ACG TTC TCT GTT GGC GGT CAC GTA TCT ATT AAC GTG AAC
   Q A V A V E L Y N N D G T T F S V G G H V S I N V N
161 GGT TCA GAG CAA GGT GAC ACT GAT GTA GGT ACT AAC TCT CCA CGT ATC AAC TTC ACA GCA ACT CAG GAT CTA GGC AAC
   G S E Q G D T D V G T N S P R I N F T A T Q D L G N
239 GGC TTT ACT GCT GAC GCT CGC GGT GAA TGG GCT CTT AAC TAC CTA GAT GGT GGT GAC GAA ACA TTT ACT ACT CGT CTT
   G F T A D A R G E W A L N Y L D G G D E T F T T R L
317 GGT TAC CTA GGT CTA ACT CAC GAT GTT TAC GGT CGT GCA GTT GGT GGT ACT CAG TGG GCA CCT TAC TAC GAT GTA GCT
   G Y L G L T H D V Y G R A V G G T Q W A P Y Y D V A
395 GGC GTT GCT GAT ATG CCT ATC GCG TTT GCG AAC GAC TTT ATC TAC GAC GAT CAC GGT AAC CTA GGT ACA GGT CGT GCG
   G V A D M P I A F A N D F I Y D D H G N L G T G R A
473 GAC AAG ATG CTT TCT TAC CGT AAC GCG ATT GAG CTG GGC GAA GCT GGT GCA ATC AAC TTC GGT CTA GGT TGG CAA GGT
   D K M L S Y R N A I E L G E A G A I N F G L G W Q G
551 TCT CAA ACA GAC GCT GAT ACC TCT CTA AAC TAC GAT GAC CGT GTT CAA GCA GCT CTT TCT TAC GAA ATC ATG GGT GCT
   S Q T D A D T S L N Y D D R V Q A A L S Y E I M G A
629 AAG ATC GGT TAC ACA TAC ACT GGC GGC GAC ATT AAA GAT GGC GTG AGC AAA GAA TCT GCT GAA TCT CAC CTA GTA TCT
   K I G Y T Y T G G D I K D G V S K E S A E S H L V S
707 GCA GCG TAC GGC TCA TAC GGT CAA GGT CTA TAC ATT GCA GCA GTT TAC GGC TCA AAC GAG AAC ATG AAC TTC AGC ACT
   A A Y G S Y G Q G L Y I A A V Y G S N E N M N F S T
785 ACT GGT GAT CGC TTA GTT GAT AGC GAT GCG TAC GAA GCG CTA CTA GCT TAC GCA CTA CCA AGC AGC CTT AAC CTA AGC
   T G D R L V D S D A Y E A L L A Y A L P S S L N L S
863 ATT AAC TAC GAA ATG GTT GAA GGT AAA ACA TTT AAG AAC TCT AAA ACT GAA ACT GCT CGT GAA GAG ATG GCT GTA CAG
   I N Y E M V E G K T F K N S K T E T A R E E M A V Q
941 GCT GAA TAC AAC TTC ACT CCT AAG TTT GTT GGT TAC GCT GGC TAC CAG TTC GAC CTA AAC GAT GCA AAC GAT CGT AAA
   A E Y N F T P K F V G Y A G Y Q F D L N D A N D R K
1019 ACA GAT GAC AAA TGG GCA CTT GGT GCT CGT TAC TAC CTA TAA TAGTAACCTGTCTAGTACTAGGAACCGCTCG
   T D D K W A L G A R Y Y L *

```

图7 ML01株 *OmpN* 基因的核酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.7 The nucleotide sequence and predicted amino acids sequence of *OmpN* from strain ML01

```

1  ATG CTT AAA AAA ATG ACG CTT CTC GCA GCA GCT ACG ATC GCA CTT TAC GGC TGT GGA GGG GGC GGT TCT TCT TCT GGT
   M L K K M T L L A A A T I A L Y G C G G G S S S G
79  TCT ACA AGC GAA AGC AAA GGT CCA CAA TCA AGC TTC GAC TAC CCA ATC CAA AAC TCA TCT TTC AAA CCT GAA GAA AGT
   S T S E S K G P Q S S F D Y P I Q N S S F K P E A S
157 ACA AAG CTT CAC TAC GTC ACT TCT GCT GAC GGT CAA CAG GGC GAA CCT ATA ACG ATA AGC TTT GAG CCA ATG GCT GTT
   T K L H Y V T S A D G Q Q G E P I T I S F E P M A V
235 CAA AAG CTC ATC GAC CGA CTA CGC GAC ACC CAG CAA GAT GAC CCT TTT ATT CCC GTT ATC CAA CTT CTG GAA AAC AAC
   Q K L I D R L R D T Q Q D D P F I P V I Q L L E N N
313 GGC ATT ACA CAG TTC TAC CTA GAC AGT AGC GAG CAA GAA GGT AAT ACC ATT TAC TTC GCT GGT ATT GAC GGT GCG CTG
   G I T Q F Y L D S S E Q E G N T I Y F A G I D G A L
391 CAT GAA GTT ACC GAC CTT TAT CTC ATT GAC TCT CTA TCC AAC GTC ATG ATG ATG AAC AGC AGC CCT CTA TTT CCG TTA
   H E V T D L Y L I D S L S N V M M M N S S P L F R L
469 GAG GGG TCA ACG GTG AAA GAG AAG GAT CCA AAC ATT GAT ATC AGC AAA CAT CTC GTA TCT GTA ATC GTA GAT TTG TCA
   E G S T V K E K D P N I D I S K H L V S V I V D L S
547 GGA GAG CAA GTG AAA CGC ATG CTT GAT TCC TTT GAT GAT AAT CCT TGG GTA AAC GCG TTA GCT GAT AAC GCT CAG TGT
   G E Q V K R M L D S F D D N P W V N A L A D N A Q C
625 AAA ACC ACT TGG AGC CAA CAA GTT GGA GAA ACA GGT GCC CGT AAG ACG TTT AAT GTC TCC GGT AAA TCG GTT GAA GCG
   K T T W S Q Q V G E T G A R K T F N V S G K S V E A
703 GCA TAC CTA ACC GAG AAA AAT ACT TAT AAC CTT GTA TGT GAC GGT ATG GAA TTG ATC GAT TCA AAA GAG TTT GAG AGT
   A Y L T E K N T Y N L V C D G M E L I D S K E F E S
781 TCT GCT GAA CGC TGG TTT AAC CCA ACT CTA GGA TTC ATT GAG CAA GTA GAA CTG CTA AAG AGT GAA CAG ATT CAA GTG
   S A E R W F N P T L G F I E Q V E L L K S E Q I Q V
859 AGA GAA ACG AAA GTA ACT TTG AAT AAG ATC GAA AAA GCT TAATTCAGCCATCAAATCTTATTTAGATAAAAAAGCAAAGGCTTTGGGGAGCACT
   R E T K V T L N K I E K A *

```

图8 ML01株 *p3I* 基因的核酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.8 The nucleotide sequence and predicted amino acids sequence of *p3I* from strain ML01

石斑鱼体内分离到哈维氏弧菌 ML01 株，人工感染实验证明，该菌株是珍珠龙胆石斑鱼幼鱼“皮肤溃疡病”的病原，其对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼的 LD₅₀ 为 2.65 × 10⁴ CFU/g 鱼体重，属于毒力较强的菌株。为了进一步分析 ML01 株的致病因子，研发特异性疫苗，本研究开展了哈维氏弧菌 ML01 株胞外产物和分泌性蛋

白的分离与特性研究。

作为哈维氏弧菌重要的致病因子，ECPs 的酶活性及溶血性与细菌的致病力关系密切。已有的研究表明，不同的哈维氏弧菌分离株，其 ECPs 的酶活性及溶血性特征存在差异。如陈雅芳等(2006)从患溃疡病青石斑鱼(*E. awoara*)和斜带石斑鱼中分离的哈维氏

弧菌 TS-628 株, 其 ECPs 具有酪蛋白酶、明胶蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、卵磷脂酶活性, 无脲酶活性, 对羊血细胞有一定的溶血活性。石存斌等(2007)从斜带石斑鱼和红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)中分离到的哈维氏弧菌 EcGY020401 株和 SpGY020601 株, 其 ECPs 具有淀粉酶、酪蛋白酶、脂肪酶活性, 无脲酶和明胶酶活性, 对非鱼类动物的溶血性很弱。沈锦玉等(2011)从大黄鱼(*Larimichthys crocea*)中分离到的哈维氏弧菌 GYC1108-1 株, 其 ECPs 具有明胶酶、酪蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶及脂酶活性, 无脲酶活性。本研究分离自患“皮肤溃疡病”珍珠龙胆石斑鱼的哈维氏弧菌 ML01 株, 其 ECPs 具有酯酶、明胶酶、淀粉酶以及酪蛋白酶活性, 无脲酶活性, 对绵羊红细胞无溶血性。显然, 在 ECPs 酶活性特征方面, ML01 株与 TS-628 株和 GYC1108-1 株较为一致, 而与 EcGY020401 株和 SpGY020601 株相差较大。在 ECPs 的溶血性方面, 各菌株则不尽相同。这说明哈维氏弧菌的 ECPs 酶活性及溶血性特征具有菌株特异性, 而与感染其的宿主种类关系不大。这也与哈维氏弧菌能对多种水产动物致病的现象相一致。

ECPs 是哈维氏弧菌重要的致病因子, 在评价其毒性时, 常常使用 ECPs 腹腔注射实验鱼并测定 LD₅₀ 的方法。石存斌等(2007)研究了 EcGY020401 株和 SpGY020601 株的 ECPs 对鲫鱼(*Carassius auratus*)幼鱼的 LD₅₀ 均为 7.1 μg/g 鱼体重, 沈锦玉等(2011)研究了 GYC1108-1 株的 ECPs 对大黄鱼的 LD₅₀ 为 3.5 μg/g 鱼体重。本研究发现, ML01 株的 ECPs 对斑马鱼的 LD₅₀ 为 19.55 μg/g 鱼体重。显然, 哈维氏弧菌 ECPs 对实验鱼的 LD₅₀ 值差异较大。本研究中, 由于选用的实验鱼种类和大小都不同, 不能通过直接比较 LD₅₀ 值来评价哈维氏弧菌各分离株 ECPs 的毒性大小。为了使不同研究得到的 LD₅₀ 值具有可比性, 建议今后在测定哈维氏弧菌 ECPs 的毒性时, 统一使用标准实验动物——成年斑马鱼作为实验鱼。

弧菌的分泌性蛋白参与众多的生理过程, 包括细菌外壁的生物发育及能量的产生、有害物质的清理和脱毒、信号转导等过程(刘笋等, 2011)。本研究分离、纯化出了哈维氏弧菌 ML01 株的 3 个主要的分泌性蛋白, 经质谱鉴定分别为 OmpU、OmpN 和一种功能未知的蛋白 P31。OmpU 和 OmpN 都是弧菌重要的外膜蛋白之一, 它们均具有强免疫原性, 可作为亚单位疫

苗的开发对象(黄辉等, 2010; Pang *et al.*, 2013); OmpU 还参与细菌结合宿主细胞的过程(黄辉等, 2010; 李岩等, 2010; 王晴, 2011¹⁾; Pang *et al.*, 2013)。本研究的结果表明, 应用硫酸铵沉淀和 Sephadex G-100 凝胶柱层析相结合的方法, 可以有效地从哈维氏弧菌培养物中纯化出 OmpU、OmpN 蛋白, 用于开展蛋白特性和致病机制的研究。此外, 本研究分离纯化出的 P31 蛋白, 其功能还需要进一步的研究。

结合质谱分析和生物信息学方法, 本研究测定了哈维氏弧菌 ML01 株 OmpU、OmpN 和 P31 蛋白的基因序列。其中, ML01 株的 *OmpU* ORF 长度为 1026 bp, 编码 341 个氨基酸, 略长于哈维氏弧菌 ATCC 33843 株的相应序列(ORF 长度为 1011 bp, 编码 336 个氨基酸), 但比王晴(2011)¹⁾报道的哈维氏弧菌 SF-1 株的相应序列长很多(ORF 长度为 969 bp, 编码 322 个氨基酸)。ML01 株的 *OmpN* ORF 长度为 1029 bp, 编码 342 个氨基酸, 与哈维氏弧菌 ATCC 33843 株的相应序列完全相同, 与哈维氏弧菌 ATCC 43516 株(GenBank 检索号: CP14039)也仅有 2 个碱基的差异, 但与其他哈维氏弧菌相应序列的相似度均小于 83%。这些结果表明, 哈维氏弧菌各分离株的 *OmpU* 和 *OmpN* 基因存在一定的差异, 这可能与分离环境和致病性有关, 在研发哈维氏弧菌的亚单位疫苗时要充分考虑。

参 考 文 献

- Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: A significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43(2): 119–124
- Chen YF, Wang J, Su YQ, *et al.* Study on the extra cellular products (ECP) of the pathogenic *Vibrio harveyi* isolated from the farmed groupers. *Marine Sciences*, 2006, 30(10): 30–34 [陈雅芳, 王军, 苏永全, 等. 养殖石斑鱼溃疡病病原哈维氏弧菌胞外产物的研究. *海洋科学*, 2006, 30(10): 30–34]
- Chen ZQ, Yao ZX, Lin M, *et al.* Study on pathogen of skin ulcer disease of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(5): 764–771 [陈政强, 姚志贤, 林茂, 等. 半滑舌鲷皮肤溃疡病病原研究. *水产学报*, 2012, 36(5): 764–771]
- He CJ, Qiu YY, Mao ZJ, *et al.* Construction of eukaryotic expression vector of OmpK of *Vibrio harveyi* and identification of protein expression in *Pichia pastoris*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2011, 30(5):

1) Wang Q. Identification and evaluation of an outer membrane protein *OmpU* from a *Vibrio harveyi* isolate as vaccine candidate in turbot (*Scophthalmus maximus*). Master's Thesis of Ocean University of China, 2011, 1–60 [王晴. 哈维氏弧菌外膜蛋白基因 *OmpU* 的克隆表达、DNA 疫苗的构建及对大菱鲆免疫效果的探究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2011, 1–60]

- 646–651 [何超军, 邱杨玉, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 真核表达载体构建及在毕赤酵母中的表达. 华中农业大学学报, 2011, 30(5): 646–651]
- Huang H, Mao ZJ, Chen JG. Cloning, expression and immunogenicity analysis of OmpU of *Vibrio harveyi* ZJ 2008. Journal of Huazhong Agricultural University, 2010, 29(3): 346–350 [黄辉, 毛芝娟, 陈吉刚. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpU 的克隆、表达与免疫原性研究. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 346–350]
- Huang PJ, Huang YC, Jian JC, *et al.* Cloning, expression and DNA vaccine analysis of OmpW of *Vibrio harveyi* ZJ 0607. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(12): 1839–1847 [黄浦江, 黄郁葱, 简纪常, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpW 基因克隆、表达及 DNA 疫苗的免疫效果. 水产学报, 2013, 37(12): 1839–1847]
- Inamura H, Muroga K, Nakai T. Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. Fish Pathology, 1984, 19(2): 89–96
- Lee KK, Chen YL, Liu PC. Hemostasis of tiger prawn *Penaeus monodon* affected by *Vibrio harveyi*, extracellular products, and a toxic cysteine protease. Blood Cells Molecules and Diseases, 1999, 25(13): 180–192
- Li Y, Pang HY, Lu YS, *et al.* Identification for immuno-reactive proteins of *Vibrio harveyi* by two-dimensional electrophoresis method. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(4): 635–642 [李岩, 庞欢瑛, 鲁义善, 等. 用免疫蛋白质组学方法筛选哈氏弧菌免疫反应蛋白. 水产学报, 2010, 34(4): 635–642]
- Li Y, Li Q, Zhang XY. Research progress on *Vibrio harveyi* and its main pathogenic factors. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014, 16(4): 159–166 [李洋, 李强, 张显昱. 哈维氏弧菌及其主要致病因子的研究进展. 中国农业科技导报, 2014, 16(4): 159–166]
- Liu PC, Lee KK, Tu CC, *et al.* Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. Current Microbiology, 1997, 35(1): 32–39
- Liu S, Wang XH, Huang J. Mass spectrometry identification of secreted proteins from 3 aquatic bacterial isolates of animal origin and analysis of their secretive sequences. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1701–1710 [刘笋, 王秀华, 黄捷. 3 株水产动物病原弧菌主要分泌性蛋白的鉴定及其分泌性序列的分析. 水产学报, 2011, 35(11): 1701–1710]
- Pang HY, Zhang XZ, Wu ZH, *et al.* Identification of novel immunogenic proteins of *Vibrio alginolyticus* by immunoproteomic methodologies. Aquaculture Research, 2013, 44(3): 472–484
- Shen GM, Shi CY, Fan C, *et al.* Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Vibrio harveyi*, the causal agent of skin ulcer disease in juvenile hybrid groupers *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂). Journal of Fish Diseases, 2017, doi:10.1111/jfd.12609
- Shen JY, Li XH, Pan XY, *et al.* Characterization of major virulent factor produced by pathogenic *Vibrio harveyi*. Journal of Zhejiang University(Agricultural and Life Science), 2011, 37(2): 142–148 [沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特性分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(2): 142–148]
- Shi CB, Hu XF, Chen XG, *et al.* Characteristics of the extracellular products of two pathogenic *Vibrio harveyi* strains. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(1): 83–87 [石存斌, 胡学峰, 陈献稿, 等. 两株致病性哈维氏弧菌胞外产物的特性分析. 水生生物学报, 2007, 31(1): 83–87]
- Teo JW, Zhang LH, Poh CL. Cloning and characterization of a metalloprotease from *Vibrio harveyi* strain AP6. Gene, 2003a, 303(1): 147–156
- Teo JW, Zhang LH, Poh CL. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. Gene, 2003b, 312: 181–188
- Wang XH, Geng XY, Li X, *et al.* Isolation and identification of skin ulcer epidemics pathogens from groupers *Epinephelus coioides*. Journal of Tianjin Agricultural University, 2012, 19(3): 19–25 [王雪惠, 耿绪云, 李翔, 等. 点带石斑鱼溃烂病病原菌的分离与鉴定. 天津农学院学报, 2012, 19(3): 19–25]
- Wei YX, Wang JC, Cheng DL, *et al.* Purification and property of extracellular proteases from *Vibrio anguillarum*. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2002, 8(4): 414–418 [魏玉西, 汪靖超, 程殿林, 等. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)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]
- Won KM, Kim SM, Park SI. Characterization of *Vibrio harveyi*, the causal agent of vibriosis in cultured marine fishes in Korea. Journal of Fisheries Science and Technology, 2006, 9(3): 123–128
- Xu XL, Shao P, Li H, *et al.* Identification and phylogenetic analyses of *Vibrio harveyi* isolated from *Plectropomus leopardus*. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(4): 112–118 [徐晓丽, 邵蓬, 李灏, 等. 豹纹鳃棘鲷致病性哈维氏弧菌的分离鉴定与系统发育树分析. 华中农业大学学报, 2014, 33(4): 112–118]
- Zhang CW, Yu L, Mao ZJ, *et al.* Cloning and expression of OmpK gene from *Vibrio harveyi* in *Pseudosciaena crocea*. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 9–14 [张崇文, 于涟, 毛芝娟, 等. 哈维氏弧菌外膜蛋白 OmpK 基因的克隆及原核表达. 水产学报, 2006, 30(1): 9–14]
- Zhang XH, Austin B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. Journal of Fish Diseases, 2000, 23(2): 93–102
- Zhang XH, Meaden PG, Austin B. Duplication of hemolysin genes in a virulent isolate of *Vibrio harveyi*. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3161–3167

Isolation and Characterization of the Extracellular Products (ECPs) and Secretory Proteins of the Pathogenic *Vibrio harveyi* Strain ML01

SHEN Guiming^{1,2}, LI Chen¹, SHI Chengyin¹①, JIA Dan^{1,2}, FAN Chao^{1,2}, XIE Guosi¹, FU Quanjie^{1,3}

(1. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory of Mariculture Epidemiology and Biosecurity, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

Abstract In recent years, *Vibrio harveyi* has become a main pathogen for mariculture animals. It caused serious diseases and mortalities of many aquaculture animals and caused huge economic loss worldwide. The isolation and identification of virulence factors of *V. harveyi* become research hotspot recently. The *V. harveyi* strain ML01 (CGMCC No. 11720) was isolated from diseased juvenile hybrid grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *Epinephelus lanceolatus* (♂) suffering from severe skin ulcer. In this research, the virulence factors, including extracellular products (ECPs) and secretory proteins of strain ML01 were extracted and purified by cellophane plate and gel filtration techniques. Furthermore, extracellular products (ECPs) and secretory proteins were characterized and identified through toxicity tests, mass spectrometry MALDI-TOF/TOF, and molecular cloning methods. The results showed that ECPs of strain ML01 had the activity of gelatinase, amylase, lipase and caseinase, but no the activity of urease. The hemolysis to sheep red blood cells of ECPs was negative. The toxicity tests showed that ECPs of strain ML01 were lethal to zebrafish and the LD₅₀ value was 19.55 μg/g body weight. Three major secretory proteins (P42, P36, and P31) corresponding to the molecular weight of 42 kDa, 36 kDa and 31 kDa on SDS-PAGE were purified from strain ML01. These proteins were identified as membrane proteins of OmpU, OmpN and a hypothetical protein of *V. harveyi* by mass spectrometry MALDI-TOF/TOF. Based on homology cloning techniques, the genes of proteins P42, P36 and P31 were amplified from the genome of strain ML01 and sequenced. The sequence alignment results showed that similarities of the open reading frames (ORFs) between strain ML01 and *V. harveyi* ATCC 33843 were 97.08% (p42), 100% (p36) and 99.67% (p31), while the similarities of peptide sequences were 99.71% (p46), 100% (p36) and 99.93% (p31), respectively. This research is of significance to further analysis of the pathogenic mechanism and the development of subunit vaccines of *V. harveyi* strain ML01.

Key words *Vibrio harveyi*; Extracellular products (ECPs); Secretory proteins; Mass spectrometry analysis; Gene cloning

① Corresponding author: SHI Chengyin, E-mail: shicy@ysfri.ac.cn