

南方鲇(*Silurus meridionalis*)豚鼠气单胞菌 溶血素的分离、纯化与致病性研究*

汪开毓^{1,2} 肖丹⁴ 贺扬² 陈德芳³
耿毅^{1,2} 刘天强⁴ 黄冠军⁴

(1. 四川农业大学动物疾病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014; 2. 四川农业大学动物医学院 雅安 625014;
3. 四川农业大学动物科技学院水产养殖系 雅安 625014; 4. 通威股份有限公司动物保健研究所 成都 610041)

提要 采用硫酸铵盐析、DEAE-Sephadex A50 凝胶层析法对豚鼠气单胞菌的溶血素进行分离、纯化, 获得分子量为 32.2kDa 的单一多肽溶血素, 测定溶血价为 2⁵。将该溶血素倍比稀释后梯度接种南方鲇, 研究其对南方鲇的致病性和组织病理损伤情况。结果表明: 豚鼠气单胞菌溶血素具有较强的毒力, 对南方鲇的半数致死剂量(LD₅₀)为 0.29mg 蛋白/kg 体重; 病鱼表现为体表褪色, 腹部膨大, 肝、脾、肾肿大, 肝、脾淤血、出血明显; 胃肠道内充有大量粘液, 黏膜充血、出血; 组织病理学表现为骨骼肌水肿、变性, 肝细胞变性、坏死, 血窦扩张淤血, 肾小管上皮细胞变性、坏死, 脾脏淋巴细胞减少, 胃肠道黏膜上皮变性、坏死, 脱落。

关键词 南方鲇, 豚鼠气单胞菌, 溶血素, 分离纯化, 致病性
中图分类号 S941.4

南方鲇(*Silurus meridionalis* Chen)隶属于鲇形目(Siluriformes)、鲇科(Siluridae)、鲇属(*Silurus*), 是一种广泛养殖于长江流域、珠江流域和闽江流域的重要经济鱼类。由于其肉质细嫩鲜美, 肌间刺少, 营养价值高, 生长快, 适应性强, 受到人们的普遍青睐。自 1985 年人工驯养繁殖成功以来, 南方鲇养殖业得到了迅速发展。随着集约化养殖规模的扩大和密度的提高, 养殖环境日益恶化, 各种细菌性疾病和寄生虫病频繁发生。

“南方鲇溃疡综合症”是南方鲇重要疾病之一。该病一年四季都有发生, 且其危害具有逐年增大的趋势。据不完全统计, 仅四川、重庆两地因该病每年给南方鲇养殖造成的经济损失在 500 万元以上(阳涛等, 2008)。本实验室对南方鲇溃疡综合症的研究发现, 其病原菌为豚鼠气单胞菌(吉莉莉, 2008)。

豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)也称豚鼠气单

胞杆菌, 属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromonas*)的一种氧化发酵性革兰氏阴性杆菌。该菌可对大多数淡水水产养殖动物致病, 是一种对水产养殖生物具有很强危害性的病原菌。流行病学调查显示豚鼠气单胞菌是我国养殖淡水鱼类及海产品中最常见的致病菌之一, 能引起鲢鱼的打印病(陈翠珍等, 2000)和白皮病、鲤鱼的竖鳞病(安利国等, 1998)、虹鳟皮肤溃烂病(丁雷等, 2002)、欧洲鳗鲡败血症(樊海平等, 1999)、鲫鱼出血性败血症(李小波等, 2003)等。目前对该病仅有一些临床报道, 而对其致病机理和致病因子方面的研究国内外均少见报道。研究表明, 豚鼠气单胞菌的胞外产物是引起养殖鱼类暴发性流行死亡的致病因子之一, 其胞外产物具有蛋白酶、脂酶、明胶酶和脲酶活性(阳涛等, 2008), 同时具有很强的溶血活性和细胞毒性(Namdari *et al*, 1990a, b)。

* 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 四川省科技厅科技支撑计划项目——南方鲇产业链关键技术集成及示范(2011NZ0071)。汪开毓, 教授, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

收稿日期: 2012-06-21, 收修改稿日期: 2012-08-17

本研究通过对豚鼠气单胞菌胞外产物中溶血素的分离纯化和致病性研究,旨在明确豚鼠气单胞菌溶血素对南方鲇的致病性和病理损伤情况,为阐述豚鼠气单胞菌的致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)为鉴定保种,分离自 2005 年四川患病南方鲇(*Silurus meridionalis*)的致病菌株。

1.2 菌种的复苏和保存

将适量的 TSB 加入菌种保存管中, 28℃, 120r/min 摇床培养 24h, 取菌液划线接种 TSA 培养基, 置于 28℃ 恒温培养箱中培养 24h, 挑取单个菌落于 TSA 平板上重复划线 2 次获得复苏菌株, 再划斜面置 4℃ 保存备用。

1.3 溶血素的粗提

在无菌条件下, 用铂耳在上述斜面上挑取菌株接种于 TSB 肉汤, 28℃ 120r/min 摇床振荡培养 36h 后收集培养物, 4℃ 12000r/min 离心 30min, 收集上清液。上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

向过滤的细菌培养上清液中加入固体硫酸铵至 75% 的饱和度, 置于 4℃ 静置过夜。次日将培养液于 4℃、10000r/min 离心 30min, 去上清, 沉淀溶于浓度为 0.05mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液中, 在相同缓冲液透析过夜, 收集透析袋内物质即为粗提溶血素。

1.4 溶血素的纯化

将粗提的溶血素加入平衡的 DEAE-Sephadex A50 凝胶柱内(1.6cm × 50cm), 用含 0—0.8mol/L NaCl 的 0.05mol/L Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液进行梯度洗脱, 流速为 0.2ml/min, 每管收集 3ml, 洗脱体积为 360ml。

根据洗脱曲线的蛋白峰, 采用微量板法测定溶血活性后, 合并有活性的蛋白峰, 于浓度为 0.05mmol/L 的 Tris-HCl (pH 7.8) 缓冲液透析过夜。用聚乙二醇 PEG-6000 浓缩, 得到纯化的溶血素。

1.5 分子量测定

采用 Laemmli 不连续 SDS-PAGE 系统, 浓缩胶为 4.0%, 分离胶为 12.5% 电泳; 考马斯亮蓝 R-250 进行染色、脱色。标准蛋白为低分子量的标准蛋白, 含 6 种不同分子量的蛋白质成分, 其分子量分别为 97.2、66.4、44.3、29.0、20.1 和 14.3kDa。

采用下列公式计算各种蛋白质的迁移率(R_f):

迁移率(R_f) = 蛋白从原点迁移的距离(mm)/从原点到参考点的距离

在 Excel 中以相对迁移率为横坐标, 以蛋白分子量 M_r 的对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程, 并根据检测蛋白的 R_f 计算出其相对分子量。

1.6 蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝法测定豚鼠气单胞菌溶血素的总蛋白含量。

1.7 溶血价的测定

参考耿毅等(2010)方法, 将纯化的溶血素用 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8)在 96 孔板上倍比稀释, 然后加入等量的 1% 的兔红细胞, 于 37℃ 放置 1h, 再于 4℃ 放置 4h。以灭菌生理盐水和蒸馏水分别作阴性和阳性对照, 测溶血价, 以溶解 50% 的红细胞的最高稀释度为溶血价。

1.8 对南方鲇致病性研究

将 35 尾南方鲇平均分成 7 组, 每组 5 尾; 其中 6 组为试验组, 另一组为对照组, 各实验组每尾鱼分别肌肉注射 0.5ml 倍比稀释的纯化溶血素, 对照组注射 0.5ml Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8), 观察 7d, 记录临床症状和发病死亡情况。同时采集死亡鱼肌肉、心、肝、脾、肾、胃、肠等组织, 以 10% 中性福尔马林固定液固定, 石蜡包埋切片, H.E 染色, 光镜观察病理学变化。

2 结果

2.1 溶血素的分离与纯化

将豚鼠气单胞菌培养 36h 后, 离心收集上清, 经 75% 饱和硫酸铵沉淀、溶解、透析、浓缩后得粗提溶血素。将粗提溶血素进行 DEAE-Sephadex A50 离子交换层析, 微量板法测定溶血活性后, 收集活性的蛋白峰。结果见图 1, 经 DEAE-Sephadex 离子交换层析

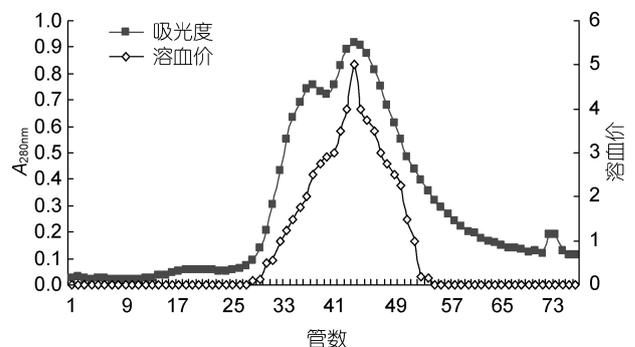


图 1 DEAE-Sephadex A50 层析洗脱曲线和溶血曲线
Fig.1 Curves of elution and hemolytic activity made by DEAE-Sephadex A50 chromatography

得到一个明显的洗脱峰,经溶血性检测发现其具有明显的溶血活性,收集该洗脱峰附近溶血活性较高的部分,经 PEG-6000 浓缩后得纯化的溶血素。

2.2 溶血素的分子量

提纯后的溶血素与等体积的上样缓冲液混合,沸水浴 5min 后,采用 SDS-PAGE 进行电泳后,考马斯亮蓝 R-250 染色、脱色(图 2)。以相对迁移率为横坐标,蛋白分子量 Mr 的对数为纵坐标作图,得回归方程($y = -1.0763x + 2.2472$, $R^2=0.9851$),计算得溶血素的相对分子量为 32.2kDa。

2.3 蛋白含量和溶血价

经考马斯亮蓝法测得溶血素蛋白含量为 0.11 mg/ml,将纯化的溶血素倍比稀释后加入 96 孔板中与等量的 1% 兔红细胞作用,结果显示溶血价为 2^5 。

2.4 溶血素对南方鲇的致病性

提纯溶血素对南方鲇具有明显的致病作用,且与剂量呈正相关。经 7d 的试验,各组的死亡数和死亡率详见表 1。经寇氏法分析结果显示,豚鼠气单胞



图 2 纯化溶血素 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 The SDS-PAGE electropherogram of the purified haemolysin

注: M. Marker; 1. 溶血素

菌胞溶血素对南方鲇的半数致死量 LD_{50} 为 0.29mg/kg 体重。

表 1 豚鼠气单胞菌溶血素对南方鲇的致病性
Tab.1 The pathogenicity of the haemolysin produced by *A. caviae* to *S. meridionalis*

组别	溶血素浓度	注射剂量	尾数	死亡数	死亡率 (%)
	0.11000	0.5	5	5	100.0
	0.05500	0.5	5	5	100.0
	0.02750	0.5	5	4	80.0
	0.01375	0.5	5	2	40.0
	0.00680	0.5	5	1	20.0
	0.00340	0.5	5	0	0
对照/TSB	0.00000	0.5	5	0	0

健康南方鲇注射溶血素后,主要表现为鱼体体色变浅、游动无力,随病程的发展,病鱼表现腹部膨大、肛门红肿,并逐步死亡。死亡鱼剖检可见腹腔内充有大量腹水;肝、脾、肾肿大并伴有充血、出血现象;胃肠道内充有大量粘液,黏膜充血、出血;对照组鱼未见以上异常现象。

病理组织学观察发现,溶血素对南方鲇多组织与器官都具有一定的损伤作用,主要表现为:骨骼肌水肿、变性,肌浆红染,肌横纹消失,肌纤维溶解、断裂、坏死(图 3a、b);肝细胞空泡变性,部分肝细胞坏死,肝血窦扩张淤血(图 3c);肾小管上皮细胞变

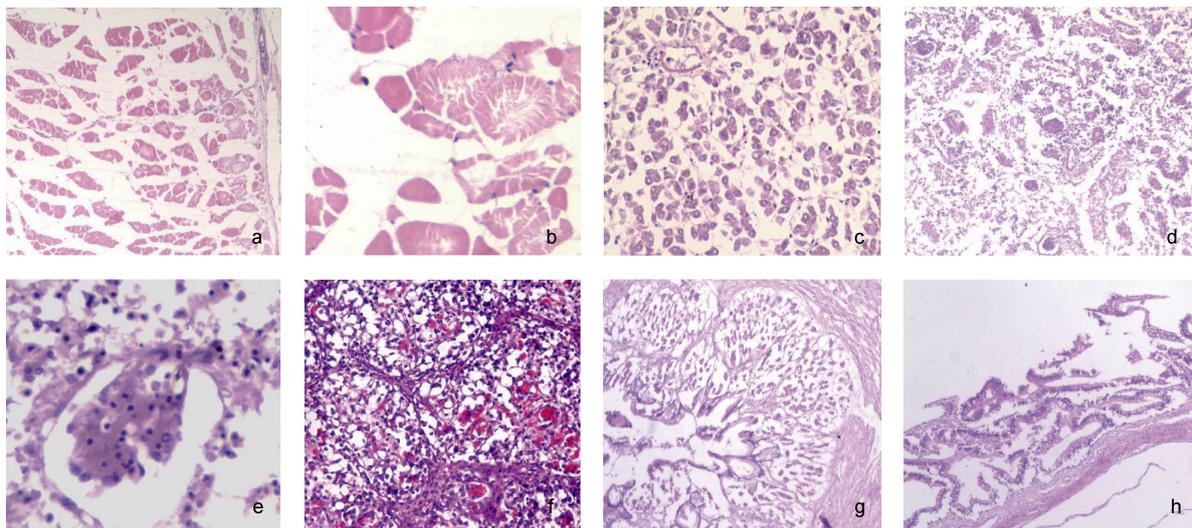


图 3 溶血素感染南方鲇的病理组织学变化

Fig.3 The histopathological changes of *S. meridionalis* infected with haemolysin

a. 骨骼肌水肿,间质增宽,肌束溶解($\times 100$); b. 肌纤维变性、坏死($\times 400$); c. 肝索紊乱,肝细胞空泡变性、溶解坏死($\times 400$); d. 肾小球萎缩,肾小管结构消失,肾间质增宽,炎症细胞浸润($\times 100$); e. 肾小球缺血,囊壁细胞变性、坏死,炎症细胞浸润($\times 400$); f. 脾脏充血、出血,淋巴细胞减少($\times 400$); g. 胃黏膜上皮变性、坏死,脱落($\times 100$); h. 肠绒毛断裂、脱落,上皮细胞变性、坏死($\times 40$)

性、坏死,局部肾小管结构完全消失,多量巨噬细胞浸润(图 3d、e);脾淤血、出血,淋巴细胞数量减少(图 3f);胃肠黏膜上皮细胞变性、坏死、脱落(图 3g、h)。

3 讨论

3.1 豚鼠气单胞菌的致病性及致病机理

豚鼠气单胞菌分布于世界各地,广泛存在于淡水、咸淡水和污水中。在较长时期内人们认为该菌在人体中的带菌现象较少,但自 1990 年以来,在世界各地痰液(李萍等,1993)、颅内(陈宗淦等,1995)、腹泻物(Namdari *et al*, 1990a, b)、腹水(侯玉敏等,1998)等多种的临床标本中均分离到呈纯培养状态的豚鼠气单胞菌,并发现了一些特殊的毒力因子,肯定了该菌在人类病原学的意义,因此已被认为是人类重要的病原菌之一。已陆续发生了多起由豚鼠气单胞菌感染引起的多种水生动物疾病:王振英等(1993)在发病鲤鱼中分离到豚鼠气单胞菌;余旭平等(1997)发现豚鼠气单胞菌是甲鱼的致病菌;吉莉莉(2008)在发现豚鼠气单胞菌是南方鲇溃疡综合症的病原;李艳和等(2010)在患病的斑点叉尾鲷分离到豚鼠气单胞菌。此外,豚鼠气单胞菌对猪(陈枝华,1993)、熊猫(吴周虎等,2006)、红嘴鸥(孔繁德,1999)等多种动物均具有一定的致病性。

豚鼠气单胞菌在水中、淤泥、鱼的消化道内及体表粘液中均有分布。正常情况下,其致病力较弱;当养殖动物体抵抗力下降时,细菌会趁虚而入,反复感染后致病力大大加强,可形成很强的传染性(阳涛等,2008)。病原菌致病包括黏附—入侵—溶解三个部分,细菌黏附鱼体后,分泌胞外产物,使鱼体上皮组织、结缔组织、肌肉组织等发生溶解、坏死,这不仅有利于细菌的扩散及进一步感染,同时胞外产物分解组织,又为细菌的生长提供营养物质。细菌随着血液系统进入鱼体的其它组织器官,在胞外毒力因子的作用下,组织器官失去相应的功能,最终导致感染动物死亡。在这一病原菌的致病过程中,溶血素为细菌提供所需的营养和 Fe 元素(Karunakaran *et al*, 1994);胞外蛋白酶,明胶酶、蛋白酶分解肌肉的组织成分,胶原蛋白成分(李玉英等,2004);脂酶分解脂质;明胶酶、蛋白酶和脂酶联合作用可破坏膜性结构,从而导致机体组织结构的广泛性损伤,致使各组织、器官功能的降低,甚至丧失,而引起死亡。总之,其胞外产物在致病过程中发挥着重要作用,其致病因子是单一成分致病还是多种成分联合致病,以及这些物质

在疾病的发生和发展过程中的作用等,均有待进一步研究,以便进一步阐明该病的致病机理。

3.2 溶血素及病理损伤机制

溶血素是病原菌在生长与繁殖过程中产生的对宿主细胞具有毒性的,有红细胞溶解活性的可溶性蛋白质。豚鼠气单胞菌溶血素的溶血活性可表现为 α -或 β -溶血,一些研究发现培养基中缺乏葡萄糖将使豚鼠气单胞菌的溶血素消失(Karunakaran *et al*, 1994)。Singh 等(1992)报道了一些不具有溶血活性的豚鼠气单胞菌株在兔回肠中连续培养后产生溶血素。由于人和动物血液中的游离铁离子远不能满足细菌生长的需要,因此环境中铁离子的缺乏可能刺激溶血素产生(Karunakaran *et al*, 1994),而含铁化合物的存在则抑制溶血素的活性。

溶血素作为病原菌的一种重要的毒力因子在细菌致病性和病理损伤机制上发挥着重要的作用。目前在水产动物病原菌致病机理的研究中,已发现嗜麦芽单胞菌(耿毅等,2010)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophilia*) (Asao *et al*, 1984)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) (Kozaki *et al*, 1989)等病原菌都能分泌毒性很强的溶血素,这些溶血素均能使红细胞大量溶解,导致鱼体贫血、缺氧死亡;且能协同胞外产物中的其它蛋白酶共同作用鱼体肌肉组织,造成鱼体体表溃烂。对其溶血谱的研究表明,溶血素具有广泛的溶血谱,对人、鸡、牛、鱼、狗等多种动物均具有溶血活性(耿毅等,2010;潘厚军等,2004)。

本研究将南方鲇源豚鼠气单胞菌的胞外产物经硫酸铵沉淀、DEAE-Sephadex A50 离子交换层析获得溶血素,经 SDS-PAGE 电泳为单一多肽分子。将该分子不具有霍乱肠毒素(Cholera toxin, CT)、志贺氏毒素(Shige toxin, ST)、大肠杆菌耐热肠毒素(*E. coli*-LT)等典型的细菌毒素的 A、B 亚基结构(雷祚荣,1993)。其结构与嗜水气单胞菌溶血素(涂小林等,1992)和嗜麦芽单胞菌溶血素(耿毅等,2010)的结构相似,均为单一的多肽分子,但分子大小存在差异,嗜水气单胞菌具有溶血活性的外毒素的分子量为 52.5kDa,嗜麦芽单胞菌具有溶血活性的外毒素的分子量为 20.76kDa,而本试验分离到的溶血素分子量为 32.2kDa。

溶血素对南方鲇的致病性试验表明,豚鼠气单胞菌溶血素对南方鲇具有明显的致病作用,并能引起南方鲇死亡。研究还发现溶血素对南方鲇的致病症状与胞外产物(阳涛等,2008)引起的症状相似:临床

表现均为鱼体褪色, 游动无力, 腹部膨大, 肛门红肿等症状; 病理组织学上均表现为多组织、器官的充血, 细胞变性、坏死, 以及炎性细胞浸润等。溶血素导致的明显胃肠病变, 与 Brenden 等(1987)报道的溶血素能引起肠道通透性增加相符。综上所述, 可推测在豚鼠气单胞菌胞外产物所致的发病机制中, 溶血素发挥着重要的作用。溶血素可引起广泛性损伤造成多器官的功能障碍, 并逐步发展到多器官功能衰竭, 最终成为引起南方鲇死亡的重要因素之一。

有研究认为, 嗜水气单胞菌外毒素的溶血过程为: 结合—聚合—插入。首先, 毒素蛋白识别并与红细胞膜表面的特殊受体蛋白结合, 然后很快进行聚合, 形成毒素多聚体, 这种多聚体再插入到细胞膜的脂质双分子层中, 使细胞膜形成空洞, 从而改变细胞膜的通透性, 导致大量液体渗入红细胞内, 最后引起细胞破裂溶解(朱越雄等, 2000), 而纯化的南方鲇源溶血素的溶血作用机理是否与此相似有待进一步研究。此外, 由于溶血素的广泛性损伤作用造成多器官功能障碍, 并逐步发展到多器官功能衰竭, 最终引起南方鲇死亡。而溶血素对组织的损伤的超微病理变化有待于进一步研究, 为致病机制的确立提供更有利的依据。

参 考 文 献

- 丁 雷, 岳永生, 2002. 虹鳟皮肤溃烂病的病原菌研究. 淡水渔业, 32(003): 28—30
- 孔繁德, 1999. 红嘴欧豚鼠气单胞菌病的分离鉴定及防治. 福建畜牧兽医, 21(3): 8
- 吉莉莉, 2008. 南方鲇溃疡综合症病原菌分离、鉴定与病理形态学研究. 淡水渔业, 38(3): 68—72
- 朱越雄, 曹广力, 2000. 嗜水气单胞菌血毒素对草鱼血细胞的溶血作用. 水产养殖, (006): 27—30
- 安利国, 傅荣恕, 1998. 鲤竖鳞病病原及其疫苗的研究. 水产学报, 22(2): 136—142
- 阳 涛, 汪开毓, 肖 丹等, 2008. 南方鲇源豚鼠气单胞菌胞外产物活性与致病性研究. 淡水渔业, 38(002): 40—45
- 李 萍, 陆天真, 1993. 下呼吸道感染者痰液分离出豚鼠气单胞菌. 上海医学检验杂志, 8(004): 241
- 李小波, 黄文芳, 2003. 丰产鲫细菌性败血病的研究——病原分离与鉴定. 微生物学通报, 30(005): 56—60
- 李玉英, 李槿年, 余为一等, 2004. 蟹源拟态弧菌胞外产物的细胞毒性和致病性初步研究. 水利渔业, 24(5): 78—80
- 吴周虎, 袁 宏, 2006. 从熊猫腹泻便中检出侵袭性大肠杆菌和豚鼠气单胞菌. 实用医技杂志, 13(017): 3006
- 陈枝华, 1993. 仔猪白痢混合感染豚鼠气单胞菌死亡病例的诊断报告. 中国畜禽传染病, (001): 18—19
- 陈宗淦, 史云丽, 1995. 5例豚鼠气单胞菌颅内感染的分析. 中国微生物学杂志, 7(003): 55—55
- 陈翠珍, 张晓君, 房 海, 2000. 鲢鱼打印病的诊断. 中国兽医科技, 30(9): 34
- 侯玉敏, 黄晓峰, 1998. 胆汁和腹水中同时检出豚鼠气单胞菌和产酸克雷伯菌. 上海医学检验杂志, 4: 251
- 耿 毅, 汪开毓, 陈德芳等, 2010. 斑点叉尾鲷嗜麦芽芽孢杆菌溶血素的分离、纯化与特性研究. 淡水渔业, 40(001): 61—65
- 涂小林, 陆承平, 1992. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析. 微生物学报, 32(6): 432—433
- 雷祚荣, 1993. 细菌毒素分子生物学. 北京: 中国科学技术出版社, 35—48
- 樊海平, 曾占壮, 余培建等, 1999. 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症. 水产学报, 23(3): 313—318
- 潘厚军, 吴淑勤, 董传甫等, 2004. 鳗致病性嗜水气单胞菌 GYK1 株的鉴定、毒力及溶血性. 上海水产大学学报, 13(1): 23—29
- Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S *et al*, 1984. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infection and Immunity*, 46(1): 122—127
- Karunakaran T, Devi B, 1994. Characterisation of haemolytic activity from *Aeromonas caviae*. *Epidemiology and Infection*, 112(02): 291—298
- Kozaki S, Asao T, Kamata Y *et al*, 1989. Characterization of *Aeromonas sobria* hemolysin by use of monoclonal antibodies against *Aeromonas hydrophila* hemolysins. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(8): 1782—1786
- Namdari H, Bottone E J, 1990a. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(8): 1796—1798
- Namdari H, Bottone E J, 1990b. Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(5): 837—840
- Singh D, Sanyal S, 1992. Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.. *Journal of Medical Microbiology*, 36(4): 269—272

ISOLATION, PURIFICATION AND PATHOGENICITY OF THE HAEMOLYSIN PRODUCED BY *AEROMONAS CAVIAE* FROM *SILURUS MERIDIONALIS* CHEN

WANG Kai-Yu^{1,2}, XIAO Dan⁴, HE Yang², CHEN De-Fang³, GENG Yi^{1,2},
LIU Tian-Qiang⁴, HUANG Guan-Jun⁴

(1. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014;

2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 3. Department of Aquaculture,

College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014;

4. Animal Health Research Institute of Tongwei Co., Ltd., Chengdu, 610041)

Abstract The haemolysin produced by *Aeromonas caviae* was salted out by ammonium sulphate precipitation and purified by chromatography on Sephadex A50. It was estimated to a homogeneous polypeptide of 32.2kDa by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Haemolysis assay showed that its haemolytic activity was 2⁵. To investigate its pathogenicity, double dilution haemolysin was intraperitoneally injected into *Silurus meridionalis* Chen. The results showed that the purified haemolysin was toxic towards *S. meridionalis*, with a half-lethal dose (LD_{50}) of 0.29mg/kg (protein/weight). Fish injected with this haemolysin exhibited symptoms of color fading, abdominal intumescence, congestion and enlargement of liver and spleen, renomegaly, gastrointestinal inflammation. Skeletal muscle appeared swollen and disruption with red stained sarcoplasm. Liver corroded to cell death and necrosis, and were congested with few sinusoid. Degeneration and necrosis was found in the renal cells, which could extend to some histolysis. Renal interstitium showed a reduced incidence of lymphocytes with numerous inflammatory cells infiltration. Spleen lymphocytes were reduction. The epithelial cells of gastrointestinal tract mucoa developed symptoms of degeneration, necrosis and desquamation.

Key words *Silurus meridionalis* Chen, *Aeromonas caviae*, Haemolysin, Isolation and purification, Pathogenicity