

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)感染后牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)血清抗菌物质的研究*

邹文政¹ 纪荣兴¹ 鄢庆枇¹ 覃映雪¹ 苏永全²
徐晓津¹ 邢颜丽¹

(1. 集美大学水产学院 福建省高校水产科学与食品安全重点实验室 厦门 361021;
2. 厦门大学海洋学系 厦门 361005)

提要 采用 1×10^7 cells/ml 的河流弧菌悬液背部肌肉注射感染牙鲆, 注射后 24h、48h 试验组的血清抗菌活力分别极显著性($P < 0.01$)和显著性($P < 0.05$)高于对照组。用 Sephadex G-25 凝胶柱对第二次人工注射感染后 24h 牙鲆血清进行分离, 其中第 7—15 收集管对河流弧菌具有抗菌活性, 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等指示菌也具有明显的抗菌作用, 在 4—100 范围内, 大部分活性分离组分随着温度的升高其抗菌活力有所增强。具有抗河流弧菌活性收集管(第 9 管)经弱阳离子交换柱分离后, OD_{280} 显示出 2 个蛋白吸收峰, 具有抗河流弧菌活性的物质主要集中在第 1 吸收峰。SDS-PAGE 分析显示经 Sephadex G-25 凝胶柱和弱阳离子交换柱分离的抗菌蛋白分子量较大。以上结果表明, 牙鲆被河流弧菌感染后能很快产生大量抗菌物质释放到血清中; 主要抗菌物质的分子量较大, 且热稳定性较好; 这些活性物质的抗菌活性具有较强的特异性。

关键词 河流弧菌, 牙鲆, 抗菌物质, 抗菌活性
中图分类号 S917

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)主要分布于中国、朝鲜半岛、日本和俄罗斯远东沿岸海区, 是亚洲沿岸的惟一牙鲆属物种(王波等, 2004)。目前, 牙鲆不仅是我国北方海水鱼类养殖的主导优良品种, 在福建、广东等地也有规模化养殖, 在繁荣沿海农村经济、促进渔民增收方面起着积极的作用。但是, 随着养殖规模的扩大、集约化程度的提高, 近年来养殖牙鲆病害频发, 其中细菌性疾病的危害尤为严重(Ishimaru *et al*, 1996; 张培军等, 2003; 宋靖芳等, 2004; 房海等, 2005; Fang *et al*, 2006; 陈晓凤等, 2008)。病害防治事关养殖的成败, 而传统的药物防治容易引起药物残留、耐药性细菌增加等不良后果, 因此亟需发展无公害的病害防治新措施。

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)广泛分布于河口海水,

具有潜在的致病能力(Biosca *et al*, 1991; 义家波等, 2008), 是海水养殖鱼类主要的病原之一(廖志强等, 2003; 鄢庆枇等, 2008), 可引起牙鲆败血症、溃烂症状(莫照兰等, 2003)、腹水病(常建波等, 2001)等。但是, 目前对河流弧菌感染牙鲆的机理以及牙鲆抗感染免疫等方面了解甚少, 也尚未有病原菌感染后牙鲆血清抗菌物质的研究报道。血清中的抗菌物质在动物抗感染免疫中起着重要作用, 探究细菌感染后鱼体血清中抗菌物质的特性, 不仅有助于了解鱼体抗感染免疫过程, 而且对于疾病的科学防治也有一定的参考价值。

本研究通过注射河流弧菌诱导牙鲆产生抗菌物质, 进而对血清中的抗菌物质进行初步分离并测定其抗菌谱等活性, 以期进一步了解血清抗菌蛋白在牙鲆抗感染免疫中的作用, 这不仅有利于了解牙鲆

* 国家“863”高技术研究发展计划, 2007AA09Z115 号; 厦门市科技项目, 3502Z20073019 号、3502Z20073020 号; 集美大学水产科学技术与食品安全省高校重点实验室开放基金项目, 2008J103 号。邹文政, 实验师, E-mail: wzhzhou@jmu.edu.cn

通讯作者: 鄢庆枇, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期: 2009-12-22, 收修改稿日期: 2010-03-09

抗感染免疫机制,对鱼病的防治也有一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

100尾牙鲢(*Paralichthys olivaceus*)购自福建东山某牙鲢养殖场,平均体重为(434.0±50.6)g,平均体长为(287.8±12.4)mm,暂养于水泥池中1周后,挑选其中外观无伤、健康活泼的70尾进行试验。

病原菌:河流弧菌(*Vibrio fluvialis*),分离于患病牙鲢,经人工感染证明有较强毒性,保存于本实验室-80℃低温冰箱(鄢庆彬等,2006)。

指示菌:金黄色葡萄球菌 1.879(*Staphylococcus aureus*)、溶壁微球菌 1.634(*Micrococcus lysodeikticus*)、大肠杆菌 1.90(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 1.884(*Bacillus subtilis*)、副溶血弧菌 1.1614(*Vibrio parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌 1.927(*Aeromonas hydrophila*),购自中国科学院微生物研究所。

Sephadex G-25(Amershan Biosciences 公司);

弱阳离子交换柱(HiTrap™CM FF, 1ml)(Amershan Biosciences 公司)。

1.2 人工感染后牙鲢血清抗菌活力的变化

1.2.1 牙鲢的人工感染 28℃培养 18—20h 的河流弧菌用灭菌生理盐水制成菌悬液,调至终浓度为 1×10^7 cells/ml。感染组牙鲢(25尾)每尾背部肌肉注射 0.3ml 菌液(1/5 LD_{50}),对照组(25尾)注射等量的灭菌生理盐水。注射后分别饲养于水泥池(400cm × 250cm)中,试验期间水温(20.6±2.1)℃。

1.2.2 血清的收集 注射后 0、1、24、48、72、96、120、144h 从试验组和对照组各取 3 尾牙鲢,尾动脉取血于血清瓶中,置于 4℃冰箱过夜析出血清。

1.2.3 血清抗菌活性的测定 采用琼脂扩散法(邹文政等,2007)测定抗菌活性,即在 45℃10%营养的营养琼脂培养基中加入终浓度为 1×10^5 cell/ml 的河流弧菌,混合均匀后倾注 30ml 于培养皿(9cm),4℃冰箱放置 1h 后在平板上用 4.5mm 打孔器打孔,在每孔中加入 20μl 待测样品,4℃冰箱静置 1h 后 28℃培养 24h,测量抑菌圈直径。以生理盐水为阴性对照,以 50 单位/ml 的链霉素为阳性对照。

1.3 抗菌物质的诱导与收集

按 1.2.1 方法对第二批 20 尾牙鲢进行注射感染,注射后 24h 从尾动脉取血,置于 4℃冰箱过夜析出血清,0.22μm 微孔滤膜过滤后分装于 2ml 血清瓶中,保存于 -80℃低温冰箱。

1.4 抗菌物质的分离及其基本特性分析

1.4.1 Sephadex G-25 凝胶过滤层析 Sephadex G-25 凝胶柱经 0.025mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 7.0)充分平衡后上样 6ml 牙鲢血清,用 0.025mol/L 的磷酸钠缓冲液洗脱,流速为 1ml/min,收集洗脱分离液,每管 1.5ml。测定各收集管的 OD_{280} 值和抗菌活性。

1.4.2 抗菌谱测定 按 1.2.3 方法测定具有抗河流弧菌活性的血清分离样对 6 株指示菌的抗菌活性,每个样品设 3 个平行。

1.4.3 抗菌活性成分的热稳定性试验 将经过 Sephadex G-25 层析具有抗菌活力的血清分离样(第 7、8、9、10、11、12、13、14、15 管)于 4℃、25℃、50℃、75℃、100℃条件下分别水浴处理 10min,按 1.2.3 方法检测对河流弧菌的抗菌活性。

1.4.4 弱阳离子柱交换层析 弱阳离子柱(HiTrap™CM FF, 1ml)经 0.025mol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 6.0)充分平衡后,上样 1ml 经过 Sephadex G-25 层析具有抑菌活性的血清组分(第 9 管)。先用 pH 6.0 磷酸钠缓冲液缓冲液洗脱 15min,再用 pH 8.0 的磷酸钠缓冲液(0.025mol/L, 1mol/L NaCl)梯度洗脱(30min 达到 100%),流速为 1ml/min,每管 1ml 分部收集。测定各收集管的 OD_{280} 值和对河流弧菌的抗菌活性,并检测具有抗河流弧菌的分离样对 6 株指示菌的抗菌活性。

1.5 抗菌活性组分的电泳

取 10μl 有抗菌活性的组分进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳。分离胶 15%,浓缩胶 3%,电泳为恒压 220V,120min,用银染法染色(马歇克等,2000)。

1.6 数据处理

试验中的每一处理至少设 3 组平行,结果以平均数±标准偏差表示,并用 EXCEL、SPSS 系统软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 河流弧菌感染对牙鲢血清抗菌活性的影响

注射组和对照组牙鲢的血清都有一定的抗菌活性,其中对照组血清的抗菌活性在整个实验过程基本稳定,而注射组牙鲢血清的抗菌活性在注射后先扬后抑。注射后 24h 注射组牙鲢的血清抗菌活性极显著高于对照组($P < 0.01$),注射后 48h 注射组的抗菌活性显著高于对照组($P < 0.05$),其余各取样时间两组均无显著性差异(图 1)。

2.2 Sephadex G-25 凝胶过滤及抗菌活性

经河流弧菌诱导 24h 后的牙鲢血清经 Sephadex

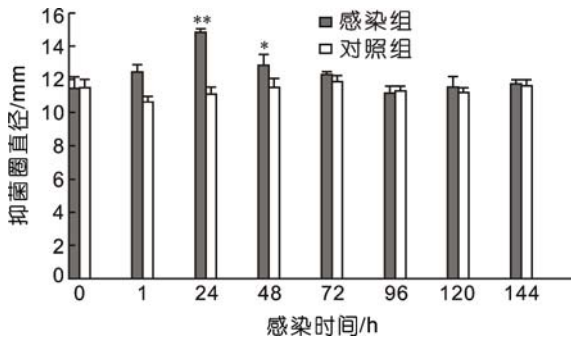


图 1 注射后牙鲈血清的抗菌活性变化

Fig.1 The variation of antibacterial activity of *P. olivaceus* serum after injection

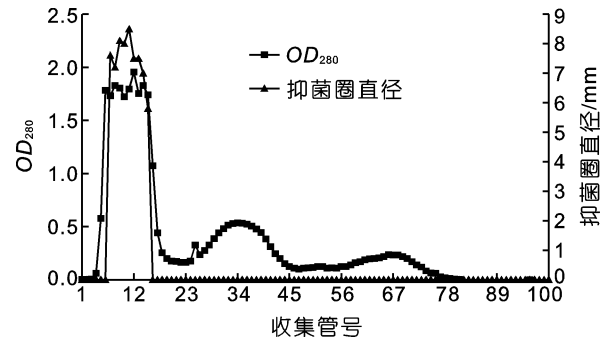


图 2 牙鲈血清 Sephadex G-25 凝胶过滤层析洗脱曲线及各部分的抗菌活性

Fig.2 Sephadex G-25 gel chromatographic patterns and antibacterial diameters of *P. olivaceus* serum

G-25 柱分离, 共收集 100 管洗脱液。通过分析各收集管的 OD_{280} 值发现洗脱曲线主要有 3 个蛋白峰, 其中以第 5 管到第 17 管的浓度最高。通过测定各收集管对河流弧菌的抗菌活性发现牙鲈血清中的抗菌活性物质主要分布于第 7—15 管中, 与第 1 个蛋白峰基本吻合(图 2)。

各活性管的抗菌谱 具有抗河流弧菌活性的 Sephadex G-25 收集管(第 7—15 管)对金黄色葡萄球

菌、溶壁微球菌均无抗菌活性。除 14、15 管分离液, 其余 7 管对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌具有较明显的抗菌活性; 此外, 9、10 管对副溶血弧菌、嗜水气单胞菌具有一定的抗菌活性(表 1)。

抗菌活性成分的热稳定性 具有抗河流弧菌活性的 Sephadex G-25 分离组分在 5 个温度下处理后, 大部分对河流弧菌仍然具有抗菌活性。从表 2 可知,

表 1 Sephadex G-25 分离后活性收集管的抗菌谱
Tab.1 Antibacterial range of antibacterial fractions separated by Sephadex G-25 gel

指示菌	抑菌圈直径(mm)									
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
金黄色葡萄球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
大肠杆菌	7.2±0.26	8.3±0.23	8.0±0.25	6.9±0.15	7.4±0.10	7.0±0.12	6.8±0.25	—	—	
枯草芽孢杆菌	11.2±0.40	14.0±0.36	11.4±0.66	13.0±0.38	11.9±0.25	12.3±0.42	10.9±0.25	8.9±0.17	—	
溶壁微球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
副溶血弧菌	—	—	5.4±0.06	5.2±0.11	—	—	—	—	—	
嗜水气单胞菌	—	5.8±0.15	5.5±0.06	5.5±0.17	—	—	—	—	—	

注: “—”表示无抑菌圈

表 2 不同温度处理对抗菌活性组分抗菌活性的影响
Tab.2 Influence of different temperatures on antibacterial activities of antibacterial fractions

收集管号	不同温度处理后抑菌圈直径(mm)				
	4	25	50	75	100
7	8.0±0.26	9.4±0.15	9.0±0.21	9.5±0.06	11.0±0.25
8	9.0±0.31	10.8±0.26	11.8±0.25	12.3±0.55	13.0±0.57
9	9.2±0.16	9.0±0.12	10.6±0.38	11.4±0.40	12.5±0.42
10	9.0±0.58	8.0±0.57	10.5±0.52	11.0±0.40	11.5±0.26
11	9.0±0.12	9.0±0.20	6.2±0.32	9.7±0.42	10.5±0.36
12	8.3±0.06	9.0±0.21	7.0±0.7	11.0±0.40	13.5±0.51
13	8.0±0.21	8.9±0.35	10.0±0.40	13.0±0.62	14.7±0.32
14	7.0±0.35	7.9±0.17	8.5±0.06	—	—
15	5.0±0.21	—	—	—	—

注: “—”表示无抑菌圈

除第 14、15 管在高温下处理后没有抗菌活性外, 第 7、8、9、10、13 管在 4—100 范围内, 随着温度升高, 抗菌活性越明显; 第 11、12 管虽然在 50 温度下处理后抗菌活性最低, 但经 75 或 100 温度处理后, 抗菌活性却有所加强; 这表明血清中的主要抗菌物质具有良好的热稳定性。

2.3 弱阳离子柱交换层析

经 Sephadex G-25 柱分离的血清组分(第 9 管)经弱阳离子柱交换层析, 共收集 50 管。由 OD_{280} 曲线可知, 样品中的蛋白质主要分布于第 1、2、3 管和第 20—27 管, 其中仅有第 1、2、3 管对河流弧菌有抗菌活性(图 3)。抗菌谱实验发现只有第 1、2 管对枯草芽孢杆菌具有抗菌活性, 其余均无抗菌活性(表 3)。

2.4 活性收集管的 SDS-PAGE 电泳

弱阳离子柱分离样(第 1、2、3 收集管), Sephadex G-25 层析柱分离样(第 8、9、10 收集管)的电泳结果

见图 4。由图可知, 经弱阳离子柱分离的组分条带比经 Sephadex G-25 层析柱分离组分少, 且更明显, 但是均未达到电泳纯。

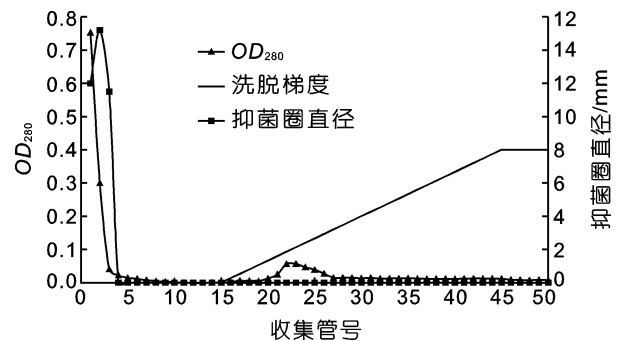


图 3 离子交换层析洗脱曲线及各收集管的抗菌活性
Fig.3 Elution patterns and antibacterial activities of *P. olivaceus* serum separated by ion-exchange chromatography

表 3 离子交换分离后活性组分的抗菌谱

Tab.3 Antibacterial range of the active fractions separated by ion-exchange chromatography

收集管号	抑菌圈直径(mm)					
	金黄色葡萄球菌	溶壁微球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌	副溶血弧菌	嗜水气单胞菌
1	—	—	—	7.5 ± 0.23	—	—
2	—	—	—	8.5 ± 0.26	—	—
3	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示无抑菌圈

3 讨论

血清中的抗菌物质在动物抗感染免疫中起着重要作用, 进入体内的微生物能够激活机体的免疫系统, 提高血清的抗菌活力。丁秀云等(1996)对皱纹盘

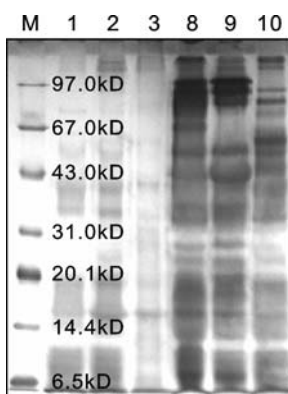


图 4 牙鲆血清抗菌组分的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE profiles of antibacterial fractions from *P. olivaceus* serum

鲍(*Halotis discus han-nai*)分别注射大肠杆菌(*E. coli*)、弧菌(*Vibrio* sp.)后 0—32h 血淋巴产生了抗菌物质, 且注射弧菌组效果较好; 鄢庆枇等(2007)发现人工注射溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)能提高大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)血清的抗菌活性。本文的研究结果证实了细菌感染能够促进鱼体产生抗菌活性物质。注射河

流弧菌后 1h, 牙鲆血清的抗菌活力就有所提高, 24h 极显著高于对照组, 这表明牙鲆能够很快产生抗菌物质, 抵御病原微生物的入侵。在感染后 72h, 感染组牙鲆血清抗菌活力恢复到对照组水平, 这说明这些抗菌物质的半衰期很短。虽然已经证实细菌感染后鱼体能够产生抗菌物质清除外源微生物, 但是, 目前尚不清楚这些抗菌物质的化学本质与作用机理。

经河流弧菌感染后牙鲆血清经 Sephadex G-25 柱分离后, 出现 3 个主峰, 但只有第 1 峰中部分收集样品中表现出抗菌作用, 其余大部分都没有抗菌活性; 同样地具有抗菌活性的 Sephadex G-25 柱分离组分(第 9 管)经弱阳离子柱交换层析后, 只有率先洗脱的物质(第 1、2、3 管)具有抗菌活性, 其余绝大部分没有抗菌活性, 这说明通过 Sephadex G-25 柱和弱阳离子柱可以有效地将大部分没有抗菌作用的物质分离开, 有助于进一步纯化抗菌物质。然而, 一方面血清经 Sephadex G-25 柱分离后的组分的抗菌活力均不如粗血清, 另一方面经弱阳离子柱交换层析后的组分抗菌谱较窄, 这可能是由于抗菌物质经 Sephadex G-25

柱、弱阳离子柱分离后被稀释,也可能是因为样品中某些成分协同作用表现出抗菌活性,过柱后这些物质被分离从而丧失了协同作用。

SDS-PAGE 电泳结果表明,经过 Sephadex G-25 凝胶过滤层析和离子交换层析过的,对河流弧菌有抑制作用的抗菌蛋白皆没有达到电泳纯。在分子量为 31—43kDa 之间和 14.4—20.1kDa 之间有共同条带。具有抗菌活性的蛋白是其中某一个成分还是多个组分,有待于进一步纯化研究。

存在鱼类血液或粘液中具有非特异性防御作用的分子主要包括:补体、凝集素、天然抗体、溶菌酶、干扰素、抗菌肽、C-反应蛋白、转铁蛋白等,这些物质能够直接杀灭或抑制入侵的病原菌(唐玫等, 2002; Magnadóttir, 2006)。本研究中牙鲈血清的抗菌活力峰值为感染后 24h,这属于非特异性免疫阶段(周光炎, 2000),凝集试验的结果也表明此时牙鲈血清中尚未有特异性抗体,这说明此时血清中的抗菌物质并非抗体或凝集素。牙鲈血清经 Sephadex G-25 柱分离后,具有抗菌活性的成分集中在第一峰,这说明抗菌物质(蛋白)分子量比较大,可能不是小分子的抗菌肽;热稳定性试验显示,在 4—100 范围内,随着温度升高,抗菌物质抗菌活性有所增强,这表明血清中的抗菌物质对热具有良好的稳定性,并非补体(唐玫等, 2002);此外,由于初步分离的抗菌物质对溶壁微球菌没有溶菌作用,因此在本研究中主要的抗菌物质可能不是溶菌酶。值得注意的是,经 Sephadex G-25 和离子交换层析分离得到的抗菌物质的抗菌谱很窄,甚至对同属弧菌属的副溶血弧菌也没有抗菌活性,这说明鱼体产生的抗菌物质的抗菌活性可能与进入体内的细菌种属有关。

从以上研究结果可以看出:牙鲈被河流弧菌感染后能够迅速开启体内的非特异性抗菌因子开关,很快产生多种抗菌物质;主要的抗菌物质可能是分子量比较大的物质;这些抗菌物质的抗菌活性具有种属特异性,并且有良好的热稳定性。

参 考 文 献

丁秀云,李光友,翟玉梅,1996. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究. 海洋与湖沼, 27(4): 362—367
王波,张朝晖,左言明等,2004. 牙鲈属主要经济鱼类的生

物学及养殖研究概况. 海洋水产研究, 25(5): 86—92
邹文政,张俊杰,鄢庆枇等,2007. 嗜水气单胞菌感染后牛蛙血清中抗菌物质的初步研究. 水产学报, 31(1): 62—67
宋靖芳,黄文芳,张剑英,2004. 牙鲈出血病病原的初步研究. 微生物学杂志, 24(2): 51—53
张培军,徐永立,张振冬等,2003. 养殖牙鲈鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析. 海洋与湖沼, 34(2): 131—141
陈晓凤,常建波,蔡道财,2008. 牙鲈“体表出血病”病原的研究. 集美大学学报(自然科学版), 13(1): 12—17
周光炎,2000. 免疫学原理. 上海: 上海科学技术文献出版社, 241
房海,陈翠珍,张晓君,2005. 牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)细菌败血症感染及病原检验与分析. 海洋与湖沼, 36(2): 159—166
莫照兰,陈师勇,谭训刚等,2003. 养殖牙鲈细菌性病原分离与鉴定. 海洋科学集刊, 45: 163—168
唐玫,马广智,徐军,2002. 鱼类免疫学研究进展. 免疫学杂志, 18(3): 112—117
常建波,宫向红,孙逢贤等,2001. 养殖牙鲈弧菌病原菌初步研究. 海洋水产研究, 22(1): 37—41
鄢庆枇,邹文政,纪荣兴等,2006. 应用荧光抗体技术检测牙鲈体内的河流弧菌. 海洋科学, 30(4): 16—19
鄢庆枇,张俊杰,邹文政等,2007. 人工感染溶藻弧菌对大黄花鱼免疫功能的影响. 水产学报, 31(2): 250—256
鄢庆枇,邹文政,纪荣兴,2008. 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)对牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)粘液的趋化和粘附作用. 海洋与湖沼, 39(4): 362—367
廖志强,纪荣兴,梅园园,2003. 福建省主要海水养殖鱼类疾病及其防治. 福建水产, 15(4): 30—35
马歇克 D R, 门永 J T, 布格斯 R R 等著,朱厚础译,2000. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 北京: 科学出版社, 141—192
Biosca E G, Amaro C, 1991. Siderophores and related outer membrane proteins in *Vibrio* spp. which are potential pathogens of fish and shellfish. Journal of Fish Diseases, 14(3): 249—263
Fang H, Zhang X J, Chen C Z *et al*, 2006. Studies on the Edwardsiellosis and characterization of pathogenic bacteria from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 25(3): 138—147
Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M, Muroga K, 1996. *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. International Journal of Systematic Bacteriology, 46(1): 155—159
Magnadóttir B, 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20(2): 137—151

ANTIBACTERIAL SUBSTANCE IN *PARALICHTHYS OLIVACEUS* SERUM INFECTED BY *VIBRIO FLUVIALIS*

ZOU Wen-Zheng¹, JI Rong-Xing¹, YAN Qing-Pi¹, QIN Ying-Xue¹,
SU Yong-Quan², XU Xiao-Jin¹, XING Yan-Li¹

(1. Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Xiamen, 361021;
2. Department of Oceanography, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract To investigate the antibacterial substance in *Paralichthys olivaceus* serum upon infection, *P. olivaceus* were injected intramuscularly at the dorsal region with *Vibrio fluvialis* (1×10^7 cells/ml). The antibacterial activity of the serum of infected *P. olivaceus* increased significantly in comparison to the control group at 24h and 48h post-injection. Sera of another group of *P. olivaceus* infected by *V. fluvialis* were collected at 24h post-injection. Three protein peaks were obtained by fractionating the sera with a Sephadex G-25 column; and the component in the first peak (No.7—15) exhibited strong anti-*V. fluvialis* activity. The antibacterial range of the antibacterial fractions were determined by six strains of indicator bacteria, among which *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were inhibited. The antibacterial activity of the antibacterial fractions increased with the temperature from 4 °C to 100 °C. The antibacterial fractions (No.9) were separated by ion-exchange chromatography, and two main peaks were obtained. The extractions in the first peak exhibited antibacterial activities against *V. fluvialis*. SDS-PAGE showed the antibacterial products were of high-molecular-weight. These results indicate that *P. olivaceus* produces multi-antibacterial-component and releases them into serum soon after being infected by *V. fluvialis*; the major antibacterial proteins are of high molecular weight and rather stable from 4 °C to 100 °C; and the antibacterial substances have specific antibacterial activity.

Key words *Vibrio fluvialis*, *Paralichthys olivaceus*, Antibacterial production, Antibacterial activity