嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳗鲡的免疫保护试验

董传甫[1] 林天龙[1] 龚 晖[1] 欧阳岁东[1] 杨 苏[2]
(福建省农业科学院 1. 畜牧兽医研究所; 2. 中心实验室, 福州 350003)

摘要: 制备出 4 株分属 3 个不同血清型嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白(MOMP)免疫刺激复合物(ISCOMs)亚单位疫苗, 腹腔注射免疫欧洲鳗鲡, ELISA 法测得免疫后第 14d 和第 30d 所采集的血清的平均抗体效价在 1∶320—1∶1280 之间。免疫印迹结果显示, 在印迹膜上对应的位置均可检测到 MOMP 的主要蛋白条带。第 40d 的免疫保护试验表明, 免疫欧鳗对 TPS-30 菌株约 100 倍半数致死剂量的攻击无免疫保护作用, 其中的 3 组被测免疫欧鳗对 TPS-30 菌株约 10 倍半数致死剂量的攻击的免疫保护率皆在 80% 以上。上述试验结果提示, 嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白是重要的保护性抗原, 在制备成 ISCOMs 亚单位疫苗的情况下, 较小的剂量免疫一次即可显示出较高的相对免疫保护率, 且没有明显的血清型特异性。

关键词: 嗜水气单胞菌; 欧洲鳗鲡; 主要外膜蛋白; 免疫刺激复合物; 共同保护性抗原
中图分类号: S94142 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)03-0285-06

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)是引起鱼类暴发性流行病的重要病原菌, 能够引起鱼类等多种动物的败血症。开展免疫防治是预防该类疾病暴发的重要手段, 国内外的有关研究人员在其疫苗的研制方面做了大量的工作。全菌灭活苗制备工艺简单, 成本低廉, 效果也不错, 问题是气单胞菌血清型众多, 按菌体 O 抗原划分, 其血清型已经超过 100 种; 而且不同血清型致病菌株可能同时混合感染同一种鱼类。因此, 目前试制的系列全菌苗和以脂多糖(Lipopolysaacharide, LPS)作为有效成分的亚单位苗, 对异种血清型毒株的免疫预防效果都不太理想。寻找不同血清型菌株共同的保护性抗原, 研制出新型亚单位疫苗则可能解决这一难题。有报道, 嗜水气单胞菌的 S 层蛋白和外毒素都是重要的保护性抗原, 能够激发鱼类产生强的保护性免疫应答[1]。但 S 层蛋白似乎仅限于血清型 O∶11 的菌株, 且不同菌株的 S 蛋白可能存在较大的异质性[2]; 而外毒素的制备程序相对复杂, 且还没有足够的证据表明致病株外毒素的免疫原性完全一致, 不同致病菌株的主要外毒素是否为同一物质还存在较大的争议[3]。近年来的研究表明, 气单胞菌的外膜蛋白含量丰富, 生物学功能复杂, 在对宿主的感染和免疫中扮演着重要的角色, 是重要的保护性抗原[4—7]。作者此前分析了嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白(Major outer membrane protein, MOMP)的有关特性, 发现不同血清型菌株的 MOMP 具有共同的部分, 且能够产生强烈的交叉免疫学反应, 推测 MOMP 可能是其主要的共同保护性抗原[8]。本研究制备出 4 株分属 3 个不同血清型的嗜水气单胞菌的主要外膜蛋白的免疫刺激复合物(Immune-stimulating complexes, ISCOMs)亚单位疫苗, 并用来免疫欧洲鳗鲡进行免疫保护试验, 旨在探讨主要外膜蛋白作为不同血清型菌株共同保护性抗原的可能性, 为有关疫苗的研究和应用提供必要的试验数据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 嗜水气单胞菌 Ah10501 菌株购自北京陆桥公司; TPS-30 菌株由浙江淡水研究所钱冬研究员提供[9]; L316 菌株和 WG-2 菌株分别分离自患败血症日本鳗鲡和欧洲鳗鲡的肝脏处, 由本研究室分离鉴定[10]。按菌体 O 抗原划分, 上述 4 株细菌分属 3 个不同的血清型[8], 对鳗鲡都具有较高的致病力。

1.2 MOMP 的制备 MOMP 的提取参考简化的方

收稿日期: 2004-07-25; 修订日期: 2004-08-20
基金项目: 国家"863"资助项目(2003AA622050); 福建省科技项目资助(2000Z077)
作者简介: 董传甫(1975—), 男; 硕士; 助理研究员, 从事鱼病研究. E-mail: dongcf@faas.cn-0591-87572462
通讯作者: 林天龙(1955—), 男; 研究员; 从事免疫学和分子生物学研究. E-mail: lintl@fz.fj.pub3.cn

法[8]进行, 主要过程为: 接种细菌于 250mL TSB 培养肉汤中, 30℃150r/min 摇床约 24h; 10 000r/min, 4℃离心 15min, 0.02mol/L Tris-HCl(pH7.5)洗涤 2 次, 收集菌体重悬于约 10mL 上述缓冲液中; 200W 超声波破碎共约 5min, 7 000r/min 4℃离心 10min 收集上清, 添加离子性去污剂 N-lauroylsarcosinate(Sigma)使其终浓度为 1.2%(质量分数); 混匀, 4℃隔夜静置; 40 000r/min(BECKMEN LK-80E) 4℃离心 40min, 下层沉淀即为主要外膜蛋白, 蒸馏水重悬, 以 BSA(华美)绘制标准曲线, Bradford 法测定蛋白浓度, 分装, -20℃保存备用。

1.3 MOMP-ISCOMs 的制备与鉴定 采用常规透析法进行, 将 MOMP 加入含 2%(质量分数)非离子去污剂 Mega-10 的 PBS 溶液中, 使之充分融解, 按照蛋白的含量添加一定比例的 QuilA(美国康奈尔大学教授Ted clark 博士惠赠)、大豆卵磷脂和胆固醇(华美); 200W 超声波共作用 10 min, 然后装入透析袋中对 0.01mol/L PBS 充分透析, Bradford 法测定蛋白浓度, 即为粗制 MOMP-ISCOMs 亚单位苗。采用透射电镜观察法对上述粗制 ISCOMs 进行鉴定。取上述 MOMP-ISCOMs 10μL 滴在铜网上, 饱和磷钨酸负染, 温箱烤干后置透射电镜(JEM-120EX)下观察并拍照。

1.4 供试鱼及饲养条件 欧洲鳗鲡(规格为 20—30g/尾)购自福建省长乐市某鳗鲡养殖场。50cm³ × 30cm³ × 40 cm³玻璃水族箱注水至缸深的 2/3 处, 每个水族箱放养鳗鲡 7—8 尾, 置于室内, 控温空调控制室温 23℃±0.5℃。水源为经紫外线照射装置处理的全自动循环水, 攻毒期间暂停循环水; 普通小型充气机连续充气直到试验结束; 欧鳗在免疫前停食暂养 7d 以上。免疫一周后适量投喂商用欧鳗饲料。

1.5 免疫、采血与攻毒 共分 4 个实验组和 1 个对照组, 每组 15 尾健康欧鳗。以灭菌生理盐水将粗制 MOMP-ISCOMs 调整为 100μg/mL 的悬液。欧鳗经鱼安定麻醉后, 每尾腹腔注射免疫上述悬液200 μL, 对照组欧鳗腹腔注射 200μL 灭菌生理盐水。采血: 免疫后的第 14d 和第 30d 分别对每个实验组及对照组随机各取 3 尾欧鳗经鱼安定麻醉处理后以一次性注射器尾椎采血 200 μL/尾, 分离血清于-20℃冰箱冻存备用, 采血后的欧鳗分开饲养。攻毒: 一免后的第 40d, 用 TPS-30 菌株腹腔注射攻毒, 攻毒剂量及分组情况见表 2, 一周内观察并统计结果。并依下列公式计算各组的免疫保护力。

免疫保护力(RPS) = {1-(受免鱼死亡率/对照鱼死亡率)} × 100%

1.6 ELISA 法检测血清抗体效价 分别以上述 4 种 MOMP 包被 ELISA 板, 常规间接 ELISA 法测定各组免疫欧鳗的血清抗体效价。经系列稀释的欧鳗血清为第一抗体, 第二抗体为林天龙等[1] 研制的鼠抗欧鳗免疫球蛋白单克隆抗体分泌杂交瘤细胞株 8H1 制备的小鼠腹水上清, 作 1∶5 000 稀释, 第三抗体为经 1∶30 000 稀释的 AP 酶标羊抗鼠抗体(Sigma), pNPP 显色(Sigma)。

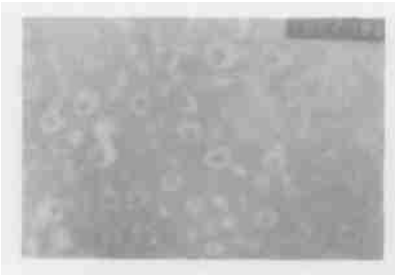


图 1 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 ISCOMs 透射电镜图(100 000×)

Fig 1 Transmission electron micrograph(100 000×) of MOMP- ISCOMs of *A. hydrophila* negatively stained with saturated phosphotungstatic acid.

1.7 SDS-PAGE 及 western-blot 杂交分析 采用 Mini-Protein cell Ⅱ系统(BioRad)进行不连续垂直凝胶电泳, 3% 浓缩胶, 12% 分离胶, 试剂配制及试验操作参照仪器使用说明进行。每个上样孔加蛋白样约 12μg。免疫印迹中, 经 1∶200 稀释的鳗鱼血清为第一抗体, 第二抗体和第三抗体同 1.6 描述, NBT-BCIP(Sigma)显色。染色凝胶用未预览蛋白标准 M(97.4kD, 66.2kD, 43kD, 31kD, 14.4kD)(GIBCO), 半对数法推算凝胶上主要蛋白质条带的分子量。

2 结果

2.1 MOMP 及 MOMP-ISCOMs

制备出上述 4 株菌的主要外膜蛋白, SDS-PAGE 分析(图 2—A)显示, 其中 3 株菌, 即 Ah10501、L316 及 TPS-30 的MOMP 结构比较接近, 都有 43kD 和 40kD 两条主要蛋白条带, 而菌株 WG-2 的 MOMP 则和其他 3 株菌的差异较大, 其主要蛋白质条带介于 43kD 和 40kD 之间。此外, 28kD 的蛋白带为 4 株细菌所共有。电镜下观察(图 1), 由上述 4 株细菌的主要外膜蛋白制备的 MOMP-ISCOMs 的直径在 30—40nm 之间, 嗜水气单胞菌的 MOMP 主要为不溶性的孔蛋白(porin), 这些蛋白质抗原可插入 QuilA 分子之间而形成暴露于 ISCOMs 表面的抗原决定簇, 中间为疏水区, 整个结构形似典型的笼形蛋白。SDS-PAGE 显示(图 3—C), 在凝胶上对应的位置可见相应的 MOMP-ISCOMs 的主要蛋白条带。

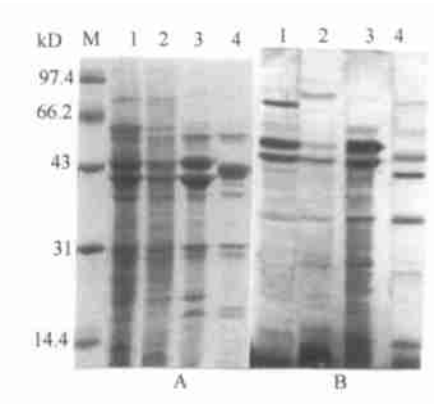


图 2　嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱(A)及其相应免疫印迹图谱(B).

Fig. 2　SDS-PAGE patterns (A) and their corresponding immunoblot patterns (B) of MOMPs of *Aeromonas hydrophila*.

M: Protein marker lane1~ 4: Ah10501, L316, TPS-30, WG-2

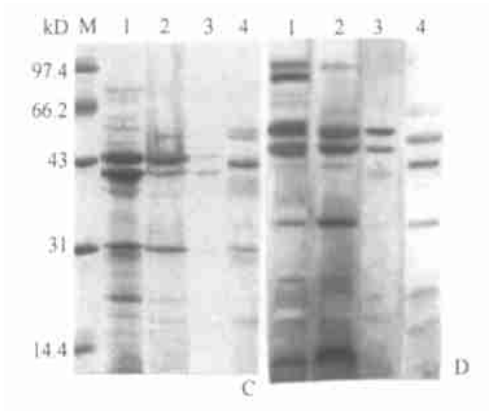


图 3　嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 ISCOMs SDS-PAGE 图谱(C)及相应免疫印迹图谱(D).

Fig. 3　SDS-PAGE patterns(C) and their corresponding immunoblot patterns(D) of MOMP-ISCOMs of *Aeromonas hydropphila*.

M: Protein marker, lane1~ 4: Ah10501, L316, TPS-30, WG-2

表 **1**　免疫欧鳗平均血清抗体效价

Tab. 1　Average serum antibody titers of immunized European eels

血清 Serum / 免疫原 Immunogens	第 14d 收集血清 Serum collected on fourteenth day				第 30d 收集血清 Serum collected on thirtieth day				对照血清 Control serum
	Ah10501	L316	TPS-30	WG-2	Ah10501	L316	TPS-30	WG-2	
10501-MOMP	1∶1280				1∶640				
L316-MOMP		1∶320				1∶320			
TPS30-MOMP			1∶1280				1∶640		< 20
WG-2-MOMP				1∶1280				1∶1280	< 20

2.2　血清抗体效价

ELISA 测得免疫欧鳗平均血清抗体效价结果如表 1 所示, 效价最低 1∶320, 最高 1∶1280, 其中 Ah10501-MOMP 和 TPS30-MOMP 的免疫欧鳗在第 30 d 的抗体效价比在第 14 d 的效价有所下降。免疫印迹显示, 无论是 MOMP 还是 MOMP-ISCOMs 都能够与自身的免疫欧鳗血清有较强的反应, 与 MOMP 在 SDS-PAGE 凝胶上相应的位置出现较强反应的条带(图 2B, 图 3D)。

2.3　免疫保护试验结果

同时测定嗜水气单胞菌 TPS-30 株对规格为 20—30g/尾的欧洲鳗鲡的半数致死剂量约为 3.0×10^6CFU/尾, 本研究用 3.0×10^8 和 3.0×10^7 两个剂量分别腹腔注射攻毒, 结果在 72 h 内出现大量死亡。如表 2 所示, 4 种免疫原的免疫欧鳗对较高剂量 3.0×10^8 的攻击均不产生免疫保护作用; 除一组未测外, 其余 3 组免疫欧鳗对较低剂量 3.0×10^7 的 TPS-30 菌液的免疫保护力(RPS) 皆在 80% 以上。LD_{50}测试组和对照组死亡鳗鱼的腹部出现柱状血斑, 部分欧鳗剖检可见腹腔内部有大量积水, 表现出典型的败血症状。

3　讨论

气单胞菌的主要外膜蛋白包括较高分子量的孔蛋白和较低分子量其他类别的外膜蛋白, 前者的分子量大约在 39kD 到 50kD 之间, 后者的分子量约在 26kD 到 28kD 之间, 两者都是病原菌粘附宿主组织和细胞的重要定植因子, 在病原菌对宿主的感染和致病过程中起着重要的作用。40kD 和 43kD 的两种保守的孔蛋白的含量丰富, 研究也最为广泛, Quinn 等[4] 利用亲和层析技术分离纯化了嗜水气单胞菌 40kD 和 43kD 两种主要外膜蛋白(命名为糖反应外膜蛋白; carbohydrate-reactive outer membrane proteins, CROMP) 并预测该两种外膜蛋白是嗜水气单胞菌的重要的粘附素; 最近, Rocha-de-souza 等[6] 则分离纯化并证明豚鼠气单胞菌 43kD 的外膜蛋白是主要的

粘附素, 能够介导细菌牢固定植于 HEp-2 细胞, 而 43kD MOMP 的多克隆抗体能够有效阻断这种定植。对于同属弧菌科的副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 而言, 一种对甘露糖敏感的 26kD 的外膜蛋白据信是粘附兔红细胞的粘附素[12]。MOMP 激发机体产生保护性免疫应答的机制可能在于, 由 MOMP 激发机体产生针对这些粘附素的特异性抗体, 抑制细菌在体内的定植, 进而减少机体发生病变的机会。

表 2 对照和免疫欧鳗对 TPS-30 菌株攻击的存活率比较

Tab. 2 Comparison of relative survival percent of control and immunized eels against challenge of TPS-30 strain

免疫原 Immunogens	攻毒剂量(cfu/尾) Challenge dosage	攻毒尾数 Number of fish challenged	存活尾数 Number of fish survival	存活率(%) Survival	免疫保护力 Relative percent survival(RPS)
10501-MOMP	3.0×10^8	6	1	1/6	0
	3.0×10^7	6	5	5/6	80%
L316-MOMP	3.0×10^8	6	1	1/6	0
	3.0×10^7	6	6	6/6	100%
TPS30-MOMP	3.0×10^8	6	1	1/6	0
	3.0×10^7	6	5	5/6	80%
WG-2-MOMP	3.0×10^8	6	1	1/6	0
	—	—	—	—	—
对照	3.0×10^8	6	1	1/6	0
Control	3.0×10^7	6	1	1/6	0

本研究选用 4 株分属于 3 个不同血清型的菌株制备其主要外膜蛋白亚单位成分疫苗, 一次微量 (20μg/尾) 腹腔注射免疫欧洲鳗鲡, 以强毒株 TPS-30 菌株攻击进行免疫保护实验, 结果表明, 上述免疫欧鳗对 TPS-30 菌株约 100 倍 LD_{50} 的攻击都没有保护, 其中有 3 组免疫欧鳗对 TPS-30 菌株 10 倍 LD_{50} 的攻击的 RPS 稳定在 80% 以上。值得关注的是, 上述 3 种免疫原来自分属两个不同血清型的 3 株细菌, 其中菌株 Ah10501 和菌株 L316 属同一血清型, L316 菌株(O:AH10501) 代表了福建欧洲鳗鲡致病性嗜水气单胞菌的主要血清型[8] 之一, TPS-30 菌株(O:9) 则代表了 20 世纪 90 年代中后期国内的江苏、浙江和湖北等地鱼类暴发性流行病的两个主要血清型之一[9]。两者不存在 O 抗原方面的交叉凝集反应, 其脂多糖在免疫印迹水平上没有明显的交叉反应(本文未显示)。利用气单胞菌的主要外膜蛋白作为亚单位疫苗的有效成分也有成功的报道, Peter 等[8] 首次报道, 纯化的杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 28kD 的外膜蛋白能够诱导虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 产生对强毒株杀鲑气单胞菌的强烈保护性免疫应答。Habibur 等则证实, 经嗜水气单胞菌主要外膜蛋白免疫的金鱼 (*Carassius auratus*) 能够耐受较高剂量同源菌株的攻击。本研究显示, 用 MOMP-ISCOMs 亚单位苗一次微量 (20μg/尾) 免疫, 即可检测到相应的抗体, 免疫印迹显示 MOMP 是强免疫原, 免疫保护试验则进一步证实 MOMP 是重要的保护性抗原, 且没有明显的血清型特异性。

选择合适的佐剂是疫苗制备技术的又一关键所在, ISCOMs 佐剂苗是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种新型佐剂疫苗, 具有廉价、高效、能激发强烈的体液免疫和细胞免疫, 并可能还是黏膜免疫的有效佐剂[13]。ISCOMs 苗在制备病毒的囊膜蛋白亚单位苗和细菌外膜蛋白亚单位苗中都有应用, 但用于水产动物的免疫保护实验还未见有报道。本研究中粗制的嗜水气单胞菌主要外膜蛋白的 ISCOMs 与经典 ISCOMs 的结构及其功效都有一定的差别, 进一步优化嗜水气单胞菌主要外膜蛋白 ISCOMs 亚单位苗的制备工艺, 制备出高纯度的 MOMP-ISCOMs 有助于提高疫苗的应用效率, 并可以对其进行更加精确的定量评定。

参考文献:

[1] Sun J H, Yan Y X, Chen H Q, *et al*. Analysis of the protective antigens of pathogenic *Aeromonas hydrophila* [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 1997, **13**(3): 20—23 [孙建和, 严亚贤, 陈怀青. 致病性嗜水气单胞菌保护性抗原的研究. 中国人兽共患病杂志,

1997, **13**(3): 20—23]

[2] Kostrzynska M, Dooley J S G, Shimojo T, *et al*. Antigenic diversity of the S-layer protein from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*[J]. *Bacteriol*, 1992, **174**(1): 40—47.

[3] Thomas J B, Howerd S P. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* is aerolysin [J]. *Infect Immun*, 1999, **67**(1): 466—467.

[4] Quinn D M, Max A H, Bretag A H, *et al*. Carbonhydrate-reaction, pore-forming outer membrane protein of *Aeromonas, hydrophila*[J]. *Infect Immun* 1994, **62**(9): 4054—4058.

[5] Habibur M, Kenji K. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, **10**: 379—382.

[6] Rocha-de-souza C M, Colombo A V, Hirata R, *et al*. Identification of a 43-kDa outer-membrane protein as an adhensin in *Aeromonas caviae* [J]. *Med. Microbiol*, 2001, 313—319.

[7] Peter L, Anrice M E, Oberter W H, *et al*. A conserve *Aeromonas salmonicida* porin provided protective immunity to rainbow trout [J]. *Infect and Immun*, 1995, **63**(8): 3 137—3 142.

[8] Dong C F, Lin T L, Yu F S, *et al*. Analysis of the major outer membraneprotein and S-layer protein of *Aeromonas hydrophila*[J]. Fishery Science of China, 2003, **10**(3): 201—205[董传甫, 林天龙, 俞伏松, 等. 嗜水气单胞菌细胞外膜蛋白及S层蛋白分析. 中国水产科学, 2003, **10**(3): 201—205]

[9] Qian D, Chen Y Y, Shen J Y, *et al*. Serogroup, virulence and hemolytic activity of *Aeromonas hydrophila* which caused fish bacterial septicaemia[J]. Acta Microbiol Sin, 1995, **35**(6): 460—464[钱冬, 陈月英, 沈锦玉, 等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性. 微生物学报, 1995, **35**(6): 460—464]

[10] Lin T L, Chen R S, Dong C F, *et al*. Isolation and identification of the *Aeromonas hydrophila* pathogenic strains from *Anguilla anguilla*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Science*, 2001, **16**(4): 35—40[林天龙, 陈日升, 董传甫, 等. 欧鳗嗜水气单胞菌的分离、鉴定和特性分析. 福建农业学报, 2001, **16**(4): 35—40]

[11] Lin T L, Chen Q, Gong H, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibody against *Anguillia anguillia* IgM[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **5**(6): 532—537. [林天龙, 陈强, 龚晖, 等. 欧洲鳗鲡免疫球蛋白单抗的制备及特性. 水产学报, 2001. **5**(6): 532—537]

[12] Kenich Nagyama, Tomiaka Oguchi, Michiko Arita *et al*. Purification and characterization of a cell-associated hemagglutinin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Infect and Immun*, 1995, **63**(5): 1987—1992.

[13] Morein B. Immunostimulatong Complex[J]. *Vet Microbiol*, 1990, **23**(1—4): 79—84.

MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN(MOMP) OF *AEROMONAS HYDROPHILA* INDUCED PROTECTIVE IMMUNITY TO EUROPEAN EELS(*ANGUILLIA ANGUILLIA*)

DONG Chuan-Fu[1], LIN Tian-Long[1], GONG Hui[1], OU-YANG Sui-Dong[1] and YANG Su[2]

(1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine;* 2. *Center laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, China* 350003)

Abstract: This study was performed to estimate the hypothesis that the major outer membrane(MOMP) of *Aeromonas hydrophila* is possibly the important common protective antigen to fish. MOMP of four strains *Aeromonas hydrophila* which belong to three different O-serogroups were prepared by treatment with 1.2% N-lauroylsarcosinate detergent, and then concentrated and purified by ultracentrifuging. Structural analysis exhibited that three of them have the same MOMP pattern and the major protein bands were 40-kilodalton and 43-kilodalton in SDS-PAGE gel. Strain WG-2 has another MOMP pattern.

To enhance the immunogenicity of MOMP, MOMP-ISCOMs(Immune-stimulating complex, ISCOMs) were prepared by dialysis assay. Transmission electron micrograph showed that MOMP-ISCOMs prepared in this study had some basic matrix profiles contrast to the typical ISCOMs.

European eels(*Anguillia anguillia)* were immunized by intraperitoneal injection(i.p) with a dose of 20μg per fish with these MOMP-ISCOMs. Serum were collected on fourteenth day and thirtieth day, respectively. The average serum antibody titers ranged from 1∶320—1∶1280 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Immunoblot indicated that all these four MOMP and four MOMP-ISCOMs could be completely recognized by the corresponding anti-serum. Challenge experiment was carried out on fortieth day with the virulent strain TPS-30 whose 50% lethal dosage(LD_{50}) to eels(20—30g per fish) is about 3.0×10^6CFU(clony forming unit) per fish. No protective effect were observed when challenged with a dose of 3.0×10^8CFU/fish, but over 80% relative percent survival(RPS) were observed when given a challenge with a dose of 3.0×10^7CFU/fish.

All these results showed that MOMP of *A. hydrophila* used as ISCOMs form is important protective antigen. A low immunized dosage could stimulate eels to produce high protective immunity, and no distinct difference was observed among different O-serogroups strains.

Key words: *Aeromonas hydrophila;* European eels (*Anguillia anguillia*); Major outer membrane protein (MOMP); Immune-stimulating complexes(ISCOMs); Common protective antigen.