

草鱼血清中一种新的凝集素免疫因子*

邵健忠 项黎新

(浙江大学生命科学学院 杭州 310012)

提要 于 1998 年 5 月—2000 年 3 月,在浙江省杭州市采集草鱼,采用硫酸铵盐析和梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,从血清中分离出一种自然凝集素,对其理化和生物学性质进行研究。结果表明,该凝集素能够识别和凝集多种不同的红细胞、细菌和酵母,具有 100 000g 离心不沉降,不被透析,耐热、耐酸、耐碱,抗 DNase、RNase、SDS 和乙醚,对胰蛋白酶、糖苷酶、糖氧化剂 NaIO_4 和 β - 巯基乙醇敏感等特性,是一种分子量为 67kD、等电点为 6.2 的糖蛋白分子。其活性能被半乳糖、乳糖、甘露糖和 N-乙酰葡糖胺所抑制,其抗原特异性不同于草鱼凝集抗体 IgM,表明两者是不同的物质。草鱼凝集素能显著地促进巨噬细胞的吞噬、杀菌能力,说明是一种重要的免疫活性因子。

关键词 草鱼凝集素,分离纯化,理化性质,免疫活性

中图分类号 Q592

凝集素是一种非免疫来源的蛋白质或糖蛋白,具有使细胞凝集和糖缀合物沉淀的能力,其功能涉及细胞生长、分化、发育和免疫等(孙册,1981,1986)。人们对凝集素的研究始于植物,以后逐步发展到动物,目前在哺乳类、爬行类、甲壳类、昆虫和软体动物中已有较为深入的研究(周柔丽,1995;梁雪莲等,1993;杨端等,1990;江红等,1996)。但鱼类凝集素的研究甚少,国内外仅见贪淡鳗鲡(*Tandanus tandanus*)、拟鲤(*Rutilus rutilus*)、铰口鲨(*Ginglymostoma cirratum*)和鳝鱼(*Monopterus albus*)等凝集素的初步报道(Kuhns *et al*, 1969; Baldo *et al*, 1970; Harisdangkul *et al*, 1972; Licastro *et al*, 1991; 宋平等,1988)。近年来,作者在鱼类免疫机制的研究中,发现草鱼血清中存在一种自然的凝集素,其性质不同于抗体,具有凝集多种外源红细胞和细菌等异物的活性,并能促进巨噬细胞的吞噬、杀菌作用,因此认为是一种新的鱼类免疫因子。本文报道其部分理化和免疫生物学性质。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

1—2 龄草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 200 余尾,鱼体长 12—25cm,体重 150—270g,于 1998 年 5 月—1999 年 10 月购自杭州市水产研究所。

1.2 红细胞

人、兔、小白鼠、鸡、鸭、中华鳖、青蛙红细胞,于 1998 年 5 月—10 月分别采集于杭州市

* 国家自然科学基金资助项目,39970589 号;浙江省自然科学基金资助项目,397300 号。邵健忠,男,出生于 1963 年 1 月,博士,教授,E-mail: lscshaoj@mail. hz. zj. cn

收稿日期: 2000-05-08, 收修改稿日期: 2000-07-25

中心血站、浙江省医学科学研究所实验动物中心和杭州市水产研究所,用 PBS 调整浓度至 10^9 ind/ml, 4℃保存备用。

1.3 酵母和细菌

酵母(*Saccharomyces carlsbergensis*)、嗜水产气单胞菌(*Aeromonas hydrophilic*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、腔隙莫拉氏菌(*Moraxella lacunata*)、普城沙雷铁丝菌(*Serratia plymuthica*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)由本院微生物研究所提供,用 1% 福尔马林 37℃处理 24h,离心沉淀菌体,加 PBS 调整浓度至 10^9 ind/ml, 4℃保存备用。

1.4 主要仪器

电泳仪(Pharmacia LKB Multiphor II 型),梯度凝胶制备仪(Pharmacia Gradient Maker Kit),倒置相差显微镜(Nikon DIAPHOT-TMD 型),柱层析系统(LKB 2023 型),冷冻干燥仪(ViFis 3.3SL 型),薄层扫描仪(岛津 CS-930 型),酶标仪(华东电子管厂 DG3022A 型),超速离心机(日立 CP80B 型)。

1.5 草鱼凝集素的分离

1.5.1 硫酸铵盐析 从实验鱼尾动脉取血,4℃静置过夜,收集上层血清,加适量 PBS 稀释后,分别加入 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55% 饱和度硫酸铵,盐析两次,离心收集沉淀,经 PBS 透析后测定凝集活性。

1.5.2 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 取 40% 饱和度硫酸铵盐析的样品,进一步用 4%—20% 梯度 PAGE 分离。电极缓冲液为 0.025mol/L Tris-0.192mol/L Gly (pH=8.3),100V 4℃电泳 6h 后取部分凝胶用于固定、染色和薄层扫描(波长 590nm)分析,其他凝胶按阴极至阳极方向依次切割成 2mm 小条,分别置电泳洗脱仪内,25mA 洗脱 2h,样品经冰冻干燥浓缩后测定凝集活性。

1.6 凝集素活性测定

凝集素样品用 PBS 二倍系列稀释后,在 96 孔板内与红细胞、酵母或细菌充分混匀,37℃孵育 4h,凝集结果用相差显微镜观察,以产生凝集的最高稀释度为样品的效价。

1.7 凝集素的理化性质测定

1.7.1 对理化因子的敏感性测定 凝集素样品分别用下列方法处理:100 000g 离心 2h;PBS 4℃透析 24h;胰蛋白酶(1mg/ml) 37℃ 2h;α 或 β-葡萄糖苷酶(1mg/ml) 37℃ 2h;0.02mol/L NaIO₄ 4℃ 12h;DNase I (0.1mg/ml) 37℃ 2h;RNaseA (0.1mg/ml) 37℃ 2h;50% 乙醚 4℃ 2h;60℃ 1h;pH=2.0 4℃ 24h;pH=10.0 4℃ 24h;1% SDS 37℃ 24h;1% β-巯基乙醇 4℃ 24h;然后测定处理前后样品凝集效价的变化。

1.7.2 分子量测定 采用 Laemmli(1970)的 SDS-PAGE 方法。层积胶浓度 3%,分离胶 10%,含 0.1% SDS。电极缓冲液为 0.025mol/L Tris-0.192mol/L Gly-0.1% SDS (pH=8.3),电压为 120V,电泳 6h。电泳前样品用还原型解离液(10mmol/L Tris-HCl pH=8.0,0.1% SDS,10% EDTA,5% β-巯基乙醇)100℃处理 3min,电泳后凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色。以磷酸化酶 B(94kD)、牛血清白蛋白(67kD)、肌动蛋白(43kD)、碳酸酐酶(34kD)和钙调素(16.7kD)为分子量标准。

1.7.3 等电点测定 采用薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳,凝胶浓度 4.2%,含 2%

Triton-X100, 1mol/L 尿素, 0.8% Ampholine pH=3.5-10, 1.6% Ampholine pH=6-8 和 1.6% Ampholine pH=4-6。电极液为 20mmol/L NaOH 和 10mmol/L H₃PO₄, 电压为 1500V, 电泳 2h。电泳后部分凝胶用考马斯亮兰 R-250 染色, 其他凝胶则从阳极至阴极的方向, 依次切割成 0.5cm 的小段, 经双蒸水充分洗脱后, 测定 pH 值, 制备标准曲线, 测定等电点。

1.7.4 糖蛋白的 PAS 染色反应 参照 Glossmann 等(1971) 方法进行。电泳后凝胶用 12.5% TCA 固定 60min, 1% 过碘酸-3% 醋酸氧化 1h, Schiff 试剂暗反应 1h, 3.7% HCl-1% Na₂O₅ 退色后观察。

1.8 糖的专一性抑制试验

在凝集素中分别加入不同浓度的蔗糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、岩藻糖、木糖、果糖、鼠李糖和 N-乙酰葡糖胺, 37℃ 作用 4h, 测定凝集活性的变化。

1.9 草鱼凝集素与草鱼抗体(IgM)的抗原特异性分析

1.9.1 凝集素抗体的制备 凝集素与等量福氏完全佐剂乳化后, 皮内多点注射新西兰兔, 10天后进行加强免疫, 每隔 5天一次, 连续 5次。第 2次开始换用福氏不完全佐剂, 第 5次不加佐剂, 并从耳缘静脉注射。然后采集少量血清, 用双向免疫扩散法检测抗体, 当效价达到 1:125 以上, 从颈动脉采血, 制备血清后用 DEAE-SephadexA-50 柱层析法分离抗体。

1.9.2 草鱼 IgM 的制备 参照陈昌福等(1995) 方法进行。草鱼注射灭活嗜水产气单胞菌后, 25℃ 饲养 3周, 取血清, 用 SephadexG-200 和 DEAE-SephadexA-50 柱层析法分离纯化 IgM。

1.9.3 双向免疫扩散试验 按常规法制备 1% 琼脂糖凝胶扩散板, 在中央孔中加入凝集素抗体, 周围孔中分别加入凝集素和草鱼 IgM, 置 37℃ 水浴扩散 24h, 观察结果。

1.10 草鱼凝集素对巨噬细胞(M ϕ)吞噬、杀菌作用的调节作用

1.10.1 草鱼 M ϕ 的分离 采用 34%—51% Percoll 密度梯度离心技术分离头肾 M ϕ (Chung *et al.*, 1988), 在 L-15 培养液(含 5% 小牛血清、10% 青霉素/链霉素)中 27℃ 培养 12h, 使用前用 PBS 清洗, 2% 台盼兰抽样染色, 当活细胞量达 98% 以上者使用。

1.10.2 草鱼凝集素对 M ϕ 吞噬、杀菌功能的调节作用 在 M ϕ 中加入凝集素和 10⁵ ind/ml 酵母菌, 27℃ 分别温育 0h 和 5h, 加 0.2% Tween20 裂解 M ϕ , 再加酵母培养液, 37℃ 培养 18h, 然后参照 Graham 等(1988) 的方法测定酵母菌的 MTT 反应值和 M ϕ 杀菌指数(Killing index, KI=5h 570nm OD 值/0h 570nm OD 值), 另设不加凝集素处理组作为对照。

2 结果

2.1 草鱼凝集素的分离与活性测定

2.1.1 草鱼凝集素的分离 经系列饱和度硫酸铵盐析结果显示, 40% 饱和度硫酸铵对凝集素有较好的分离效果(表 1)。盐析样品进一步用梯度 PAGE 分离, 结果出现了 10 条主要的分离带, 活性检测显示第 6 号分离带为凝集素组分(图 1), 经洗脱回收, 所得样品在 PAGE 和 SDS-PAGE 中均呈现单一组分, 说明已达到分离纯化的要求(图 2、图 3)。

表 1 不同饱和度硫酸铵对草鱼凝集素分离效果的比较

Tab.1 Effect of different saturation ammonia sulphate on the saperation of grass carp agglutinin

饱和度	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%
凝集效价*	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁶	2 ⁻⁴	2 ⁻⁴	2 ⁻³

* 测定细胞为兔红细胞或嗜水产气单胞菌

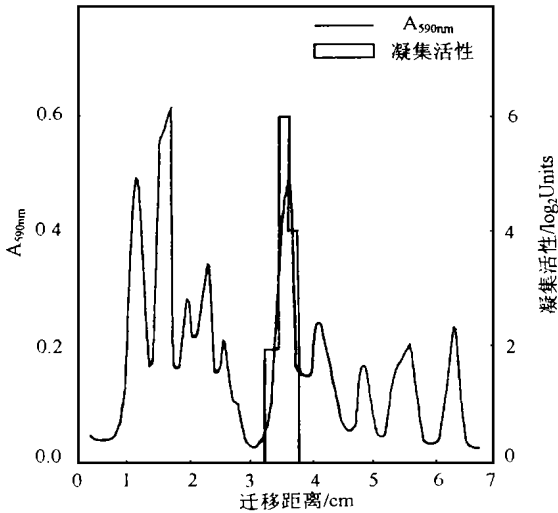


图 1 草鱼凝集素的梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及活性测定

Fig. 1 Isolation and activity determination of grass carp agglutinin by gradient polyacrylamide gel electrophoresis



图 2 草鱼凝集素分离样品的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of grass carp agglutinin samples obtained during each isolating step
A. 草鱼全血清; B. 40% 饱和度硫酸铵分离的凝集素样品; C, D. 梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化的凝集素样品

2.1.2 草鱼凝集素对异种红细胞、酵母和细菌的凝集作用 本实验结果显示, 草鱼凝集素对人和 6 种动物的红细胞以及酵母和 8 种不同的细菌, 包括革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌, 都有不同程度的凝集作用。这表明草鱼凝集素能识别和结合多种不同的异种细胞, 是一种广谱的非特异性自然凝集因子(表 2)。

表 2 草鱼凝集素对异种红细胞、酵母和细菌的凝集活性

Tab. 2 Agglutinating activity of grass carp agglutinin to heterogeneous erythrocytes, yeast and bacteria

细胞种类	凝集效价	细菌种类	凝集效价	革兰氏染色
人红细胞	2^{-5}	嗜水产气单胞菌	2^{-6}	阴性
兔红细胞	2^{-6}	金黄色葡萄球菌	2^{-4}	阳性
小白鼠红细胞	2^{-5}	大肠杆菌	2^{-6}	阴性
鸡红细胞	2^{-2}	枯草芽孢杆菌	2^{-4}	阳性
鸭红细胞	2^{-4}	腔隙莫拉氏菌	2^{-5}	阴性
中华鳖红细胞	2^{-5}	普城沙雷铁丝菌	2^{-4}	阴性
青蛙红细胞	2^{-5}	短芽孢杆菌	2^{-4}	阳性
酵母	2^{-5}	唾液乳杆菌	2^{-5}	阳性

2.2 草鱼凝集素理化性质的测定

2.2.1 分子性质 草鱼凝集素经 100 000g 离心不沉降, 用半透膜透析活性不受影响,

对胰蛋白酶、糖苷酶和糖氧化剂 NaIO_4 敏感,抗 DNase、RNase 和乙醚,耐热,在 $\text{pH}=2.0-10.0$ 范围内活性稳定,对 SDS 具有抗性,对 β - 巯基乙醇敏感。表明草鱼凝集素不是一种巨球蛋白或核酸类大分子,也不是一种小分子物质或脂类化合物,而是一种对热、酸、碱、SDS 等理化因子稳定的糖蛋白分子,其糖的修饰对凝集活性具有重要作用(表 3)。

表 3 草鱼凝集素的理化性质测定

Tab. 3 Assay of physico-chemical characteristics of grass carp agglutinin

理化因子	凝集素活性*		理化因子	凝集素活性*	
	处理前	处理后		处理前	处理后
10^5g 离心 4°C 2h	2^{-6}	2^{-6}	RNase 37°C 2h	2^{-6}	2^{-6}
透析 4°C 24h	2^{-6}	2^{-6}	乙醚 4°C 2h	2^{-6}	2^{-6}
胰蛋白酶 37°C 2h	2^{-6}	0	60°C 1h	2^{-6}	2^{-6}
α - 葡萄糖苷酶 37°C 2h	2^{-6}	2^{-1}	$\text{pH}=2.0$ 4°C 24h	2^{-6}	2^{-6}
β - 葡萄糖苷酶 37°C 2h	2^{-6}	2^{-1}	$\text{pH}=10.0$ 4°C 24h	2^{-6}	2^{-6}
NaIO_4 4°C 12h	2^{-6}	2^{-1}	1% SDS 37°C 24h	2^{-6}	2^{-6}
DNase 37°C 2h	2^{-6}	2^{-6}	β - 巯基乙醇 4°C 24h	2^{-6}	2^{-1}

* 测定细胞为兔红细胞或嗜水产气单胞菌

2.2.2 分子量、等电点测定和糖蛋白显色反应 草鱼凝集素的分子量为 67kD, 等电点 (pI) 为 6.2, 糖蛋白显色反应呈阳性, 表明是一种酸性糖蛋白分子(图 3)。

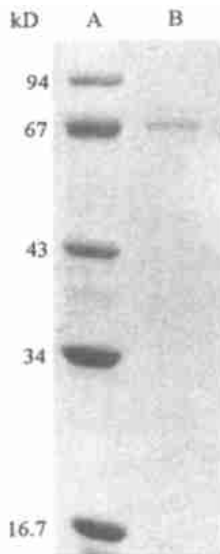


图 3 草鱼凝集素的 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳及分子量测定

Fig. 3 Molecular weight determination of grass carp agglutinin by SDS- polyacrylamide gel electrophoresis

A. 分子量标准; B. 草鱼凝集素

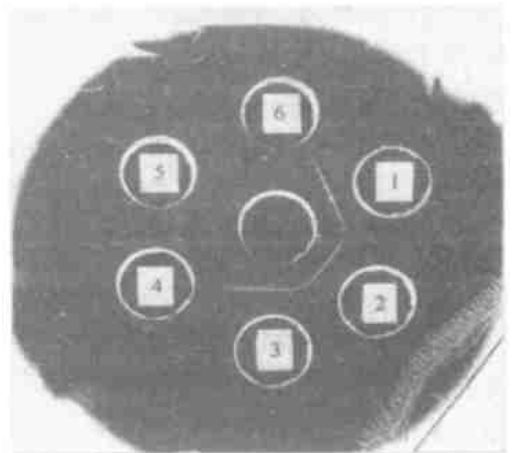


图 4 草鱼凝集素与草鱼抗体(IgM)的抗原性质分析

Fig. 4 Analysis for antigenic characteristics of grass carp agglutinin and antibody (IgM)

1-3. 提纯的凝集素; 4-6. 提纯的 IgM

2.3 草鱼凝集素的糖专一性抑制试验

结果表明, 半乳糖和乳糖对草鱼凝集素活性有较强的抑制作用, 两者的最低抑制浓度

分别为 0.125mol/L 和 0.25mol/L, 其次甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺对凝集反应也有一定的抑制作用, 两者的最低抑制浓度为 0.3mol/L。

2.4 草鱼凝集素与草鱼抗体(IgM)的抗原特异性分析

结果显示, 草鱼凝集素能与其抗体结合而在免疫扩散试验中出现明显的沉淀带, 而草鱼抗体(IgM)则不能与凝集素抗体结合, 免疫扩散试验结果呈阴性。说明草鱼凝集素与抗体(IgM)具有不同的抗原特异性, 是两种不同的物质(图 4)。

2.5 草鱼凝集素对巨噬细胞(M ϕ)吞噬、杀菌功能的调节作用

实验中, 草鱼 M ϕ 的吞噬、杀菌功能用剩余活酵母 MTT 反应的光密度值以及 KI 表示。结果显示, 凝集素处理组所剩余的活酵母量与未经凝集素处理组相比, 明显减少, M ϕ 杀菌力极显著地增强 ($P < 0.01$)。表明草鱼凝集素对 M ϕ 的吞噬、杀菌功能有明显的促进作用(表 4)。

表 4 草鱼凝集素对 M ϕ 吞噬、杀菌功能的调节作用

Tab. 4 Regulation effect of grass carp agglutinin on the phagocytosis and bactericidal activity of M ϕ

实验组别	MTT 反应(OD _{570nm}) [*]	KI 值 [*]	t 检验 ^{**}
吞噬 0h 对照	0.78 ± 0.02	—	—
吞噬 5h, 不加凝集素	0.67 ± 0.01	0.86 ± 0.02	—
吞噬 5h, 加凝集素	0.55 ± 0.01	0.71 ± 0.01	$P < 0.01$

* $X \pm SD$, $n = 5$; ** 与不加凝集素的对照组比较

3 讨论

研究结果表明, 与许多其他动物一样, 草鱼中存在自然的凝集素因子, 它不仅能凝集多种动物的红细胞, 而且还能广泛地凝集不同的细菌, 包括革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌, 这在以往的凝集素研究中报道得不多。目前认为, 鱼类中能够识别和结合红细胞、细菌等异己抗原的物质主要是抗体(IgM), 但本文报道的凝集素不同于抗体, 表现在抗体是经特定的抗原免疫后产生的, 具有特异性, 而凝集素是自然存在的, 不需经免疫而产生, 能与多种抗原发生凝集, 具有非特异性。此外, 两者在分子量、等电点等理化性质和抗原特异性方面也存在很大的差别, 表明是两类不同的物质。

目前, 对鱼类等水产动物免疫相关因子如抗体、干扰素等的研究已有一定的报道(邵健忠等, 2001; 刘树青等, 1999; 牟海津等, 1999), 但鱼类凝集素的研究还不多, 国内外仅见贪淡鳗鲡、拟鲤、铰口鲨和鳙鱼等血清或卵细胞凝集素的初步研究, 有关其理化和生物学性质未见深入探讨, 免疫生物学功能则尚无报道。在生物进化中, 鱼类是最早产生抗体的低等脊椎动物, 但其抗体种类和功能单一, 仅有凝集抗体 IgM, 因此其免疫功能尚不完善。本文研究结果提示, 凝集素的存在, 在一定程度上弥补了这方面的不足, 它通过有效地识别和结合异己物质, 提高巨噬细胞对它们的吞噬、杀灭作用而在鱼体的免疫防御中起着重要的作用。因此, 鱼类凝集素很可能作为鱼体防止外源微生物等入侵的一道防线, 是一种重要的免疫因子。研究结果为进一步开展鱼类凝集素的性质与功能以及鱼类免疫机制研究打下了基础。

致谢 罗依慧同志参加部分工作, 并承蒙毛树坚教授指导, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 江 红, 孙 册, 1996. 软体动物凝集素. 生命的化学, 16(5): 28—31
- 牟海津, 江晓路, 刘树青等, 1999. 日本对虾溶血素的活性测定及性能研究. 海洋与湖沼, 30(4): 362—367
- 刘树青, 江晓路, 牟海津等, 1999. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼, 30(3): 278—283
- 孙 册, 1981. 凝集素研究进展. 生物化学与生物物理进展, 8(3): 15—25
- 孙 册, 1986. 凝集素. 北京: 科学出版社, 20—50
- 宋 平, 熊全沫, 1988. 黄鳍血清中凝集素的分离纯化及其部分理化性质. 水生生物学报, 12(3): 279—282
- 邵健忠, 项黎新, 2001. PHA 体外诱导草鱼白细胞产生 γ -干扰素的研究. 海洋与湖沼, 32(2): 117—124
- 杨 端, 王正新, 张龙翔, 1990. 中国鲎凝集素的分离纯化及性质研究. 生物化学杂志, 6(6): 505—509
- 陈昌福, 纪国良, 罗宇良等, 1995. 草鱼体表和肠粘液中免疫球蛋白的初步研究. 见: 中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室编. 鱼病学研究论文集. 北京: 海洋出版社, 21—25
- 周柔丽, 1995. 哺乳动物凝集素及其生物学作用. 生命的化学, 15(5): 12—15
- 梁雪莲, 王克夷, 1993. 竹叶青蛇毒凝集素的分离纯化及特性研究. 生物化学与生物物理学报, 25(5): 515—520
- Baldo B A, Boettcher B, 1970. Natural erythrocyte agglutinin in the serum of the australian freshwater catfish, *Tandanus tandanus* (Mitchell). Immunology, 19: 569—581
- Chung S, Secombes C J, 1988 Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. Comp Biochem Physiol, 89B(3): 539—544
- Glossmann H P, Neville M, 1971. Glycoproteins of cell surface. J Biol Chem, 246: 6339—6342
- Graham S, Jeffries A H, Secombes C J, 1988. A novel assay to detect macrophage bactericidal activity in fish: factors influencing the killing of *Aeromonas salmonicida*. J Fish Dis, 11: 389—396
- Haisdangkul V, Kabat E A, Mc Donough R J *et al*, 1972. A protein in normal nurse shark serum which reacts specifically with fructosans. J Immunol, 108(5): 1244—1257
- Kuhns W J, Nigrelli R F, Chuba J V, 1969. Effects of temperature upon “naturally occurring” blood group agglutinins in fresh water catfish. J Immunol, 103(1): 62—65
- Licastro F, Barbieri L, Krajhanzi A *et al*, 1991. A cortical lectin from the oocytes of *Rutilus rutilus* stimulates mitogenic activity and release of soluble factors from human lymphocyte cultures and inhibits protein synthesis in a cell-free system. Int J Biochem, 23(1): 101—105
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227: 680—685

A NATURAL IMMUNOREACTIVE AGGLUTININ ISOLATED FROM SERUM OF GRASS CRAP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

SHAO Jian- Zhong, XIANG Li- Xin

(*College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou, 310012*)

Abstract A naturally occurring immunoreactive agglutinin was isolated from serum of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by means of salting out in ammonium sulphate and gradient polyacrylamide gel electrophoresis were used during May, 1998 to march, 2000 in Hangzhou City, Zhejiang Province of China. Bio- physiochemical studies showed that the agglutinin has haemagglutinating activity for a variety of animal erythrocytes, bacteria and yeast cells. It couldn't be dialyzed and sedimented at 100 000g, exhibited stability to heat, pH= 2, pH= 10, DNase, RNase, SDS and lipid solvent aether, but sensitive to trypsin, glucosidase, sugar oxidant NaIO_4 and β - mercaptoethanol. It was shown to be a glycoprotein with the molecular weight of 67kD and isoelectric point of 6.2. Its activity could be inhibited by galactose, lactose, mannose and N- acetylglucosamine respectively, and its antigenic characteristic was not the same as that of antibody (IgM) of grass carp, which indicated that this agglutinin was a substance different from antibody. That the phagocytic and bactericidal activity of grass carp macrophages could be significantly increased by this agglutinin, indicates that the agglutinin is probably an important immune factor in fish.

Key words Agglutinin of grass carp, Isolation, Bio- physiochemical characteristics, Immune activity