

Abscisin 酸 定量分析을 위한 放射免疫測定法

黃台益* · 林賢玉** · 金容在* · 李民化***

Radioimmunoassay for the Quantitative Analysis of Abscisic Acid

Tae Eak Whang*, Hyun Ock Lim**, Yong Jae Kim* and Min Wha Lee***

ABSTRACT

A radioimmunoassay technique has been developed for the quantitative analysis of Abscisic acid (ABA). The antibody, obtained by immunizing rabbits against a conjugate of ABA with human serum albumin, had a high affinity ($K_a=3.28 \times 10^{13}$ l/mol) for ABA. The use of ^3H -labelled ABA as tracer and of dextran-coated charcoal for separation of free ABA from antibody-bound ABA permitted detection of as little as 0.5×10^{-12} mol ABA. The measuring range extended to 14×10^{-12} mol. Because of the high specificity of this immunoassay, no extract purification steps were required prior to analysis. And then, only 2 hr in radioimmunoassay was required to ABA analysis.

From these results, it is suggested using this assays that more than hundreds samples can be assayed sensitive and simple per day for ABA.

緒 言

Abscisin 酸(Abscisic acid, ABA)은 植物에 있어서 水分不足에 의한 氣孔의 開閉, 葉의 脫落, 老化, 休眠, 그리고 生長促進 등 廣範圍한 生理的 機能에 關與하는 調節物質로 알려져 있다.^{5,6,8,9,11)} 다른 植物 調節劑보다 뒤늦게 發見되었으나 그 機能이 多様な 만큼 研究도 活潑하게 展開되고 있다.

그러나 一般的으로 植物호르몬은 含量이 대단히 微量이기 때문에 正確한 分析이 어렵다. 特히 農學의 利用을 위해서는 同時에 많은 量의 試料을 分析할 수 있어야 되기 때문에 一時에 多量의 試料을 正確하게 定量分析할 수 있는 方法이 要請되는 것이다.

지금까지의 ABA 分析은 주로 器機的 分析方法에 의 존하고 있다. 실제로 Bangerth¹⁾는 gas chromatogra-

phy-mass spectrometry로 20 pg까지 分析 檢出하였고 Rajasekaran¹¹⁾은 gas chromatography-mass spectrometry selected ion monitoring으로 100 pg 單位까지 分析하였으며, Rivier¹²⁾는 gas chromatography-electron capture로 2 ng 單位까지 分析했다. 이러한 分析方法들은 여러 단계의 抽出과정과 精製가 필요하며 적어도 1回 以上 chromatography에 依한 精製過程이 必要하다.

本 研究에서는 위와 같은 器機分析方法和 比較될 수 있거나 더 精確하며 同時에 많은 試料을 分析處理할 수 있는 ABA에 대한 放射免疫測定法(Radioimmunoassay, RIA)을 開發하였다.

RIA는 Yalow¹⁶⁾ 등에 의해서 최초로 insulin RIA가 開發된 이래 Catt²⁾ 등 많은 研究者들에 의해 改良發展되어 현재 醫·藥學分野에서는 生體의 微量物質 測定에 널리 이용되고 있다.

* 全南大學校 農科大學(Coll. of Agriculture)

** 全南大學校 自然科學大學(Coll. of Natural Science)

*** 全南大學校 醫科大學(Coll. of Medicine, Chonnam National Univ. Kwang Ju 500, Korea) (1985. 1. 9 接受)

植物分野에서는 Fucks⁴⁾에 의해서 免疫分析의, 가 능성만 示唆된 후에 Pengelly¹¹⁾에 의해서 IAA-RIA 가 開發되어 ng까지 그리고 Weiler^{14, 15)}에 의해서 ABA-RIA가 開發되어 報告되었을 뿐 이 分野에서는 이제 초기 단계에 머무르고 있는 실정이다.

本 研究에서는 ABA-RIA를 開發하여 改良 發展시 키는 약간의 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

(±)-ABA는 독일 Calbiochem-Behring社에서 (+)-ABA 등 ABA類는 Sigma化學社에서, (³H)(±)-ABA는 英國 Radio-chemical center, Amersham 會社에서 각각 구입했으며 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide·HCl과 사람血清 albumin(HSA)은 美 Sigma化學社, Freund's complete adjuvant는 美 Difco社製, Scintillation cocktail用 pop, popop와 toluene은 Peckard社 그리고 Triton X-100은 New England Nuclear社에서 각각 구입해 사용했다. phaseic acid와 dihydrophaseic acid는 Zeevarrt¹⁷⁾의 方法에 依해서 大豆에서 分離하였으며 家兔는 Californian種을 全南養兔協會에서 분양받았다.

蒸溜水는 金屬 이온을 除去시키기 위해서 美國 Barnstead社의 NANO pure cartridge system을 通過시켜 電氣抵抗이 18 megohm-cm되는 것을 利用했다.

2. 方 法

1) 放射免疫測定法을 위한 ABA抗原의 調製

ABA는 分子량이 264.3으로써 직접 抗體를 生成시키지 못하는 hapten이기 때문에 巨大分子化가 必要하다. 따라서 ABA를 다음과 같이 사람血清 albumin에 結合시킨 다음 抗原으로서 使用하였다.

即, HSA에 4ml H₂O를 加한 다음 pH를 8.7로 調整하고 냉각시킨 뒤 30.6mg (±)-ABA를 넣었다. 0.25 μCi(³H)(±)-ABA 0.1ml를 N₂氣流로 건조시킨 후 여기에 H₂O/dimethyl formamide (1:2 v/v) 混合液 20ml를 加하고 pH를 1N NaOH로 8.1 以上으로 維持하였다. 結合劑로서 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide·HCl(EDC, 85.2 mg)을 4等分하여 30分 간격으로 4회에 걸쳐서 加하고 이를 19時間 동안 攪拌하면서 放置하였다.

上記 方法에 依한 ABA의 HSA에 대한 統合率은 結合前 (³H)(±)-ABA의 放射能 測定으로 計算한바

1.5 μmol HSA에 3.474 μmol의 ABA가 結合된 것으로 나타났다.

以上과 같이 ABA를 HSA에 統合시킨 溶液은 4일 동안 4°C에서 外液에 對하여 透析하고 凍結乾燥機로 乾燥한 다음 -20°C에 보관했다.

2) 抗體의 準備

위와 같이 마련된 抗原을 3~5個月된 californian種 家兔의 암컷에 다음과 같이 接種하였다.

即, 10mg ABA-HSA抗原을 0.9% NaCl 1ml에 용해시킨 다음 이를 0.9% NaCl로 10倍 희석한 뒤 10ml Freund's complete adjuvant와 섞어서 virtis homogenizer로 均質化하였다. 家兔의 背部를 脫毛한 뒤 上記抗原液 1.5ml를 15~20여군데에 0.1ml씩 皮下注射했다. 첫 注射 8週後에 力價를 檢査한 뒤 다시 同一抗原液 0.3ml씩을 追加 接種하였다. 追加 接種 1~2週後에 家兔의 耳靜脈에서 20ml 정도의 血液을 뽑아 ABA 抗血清을 分離하여 이를 適當한 力價가 되도록 희석하여 使用했다.

3) 放射免疫測定法(RIA)

試料 0.1ml(試料 ABA 또는 測定코자 하는 未知의 ABA含有 抽出溶媒)에 phosphate buffered saline (0.01M sodium phosphate, 0.15M sodium chloride, pH 7.4) 0.5ml와 0.1ml (³H)(±)-ABA(0.753 p mol / 0.1ml, 50000 dpm) 그리고 1:1.150 力價(50% 抗原-抗體結合能을 일으킴)의 ABA抗血清 0.1ml(또는 非特異的 結合測定을 위해서는 H₂O)를 12×60mm 遠心管에 넣고 90分 동안 4°C에서 靜置했다. 靜置가 끝나면 抗體에 結合된 抗原과 遊離抗原을 다음과 같이 dextran-coated charcoal 方法으로 分離했다.

Dextran-coated charcoal은 phosphate buffered saline(PBS) 100ml에 charcoal(Norit A) 0.32g을 浮遊시킨 후에 dextran (MW: 70,000) 80mg을 加하여 4°C에서 2時間 이상 放置하여 調製하였다.

Dextran-coated charcoal 0.5ml를 上記 靜置混合液에 加하여 5分 동안 4°C에 放置한 다음 2,800RPM에서 8分間 遠心했다. 上層液을 12×60mm plastic vial에 옮겨 1ml scintillation cocktail을 加한 다음 이 vial을 다시 10ml scintillation cocktail이 들어 있는 20ml counting vial 속에 넣어서 放射能을 Peckard Tricarb-300 scintillation counting system으로 測定하였다.

結果

1. ABA의 放射免疫 測定法

1) 抗血清

ABA 抗原을 家兔에 첫번째 皮內注射한 후에 높은 力價를 誘導하기 위해 2차례의 追加接種을 實施한 뒤에 얻은 家兔의 抗血清 力價는 個體間의 差異가 크게 나타났다. ABA 抗原을 接種한 20마리의 家兔中에서 단지 5마리가 높은 力價를 나타냈으며 그 중에서도 R-1 家兔는 가장 높은 力價를 나타냈다.

R-1 抗血清은 그림 1에 表示한 바와 같이 1:1, 150의 희석에서 50%의 抗原-抗體 結合能을 나타냈다. 以下の 모든 ABA의 分析에서는 R-1 家兔에서 採血分離한 抗體를 1:1,150으로 희석하여 使用하였다.

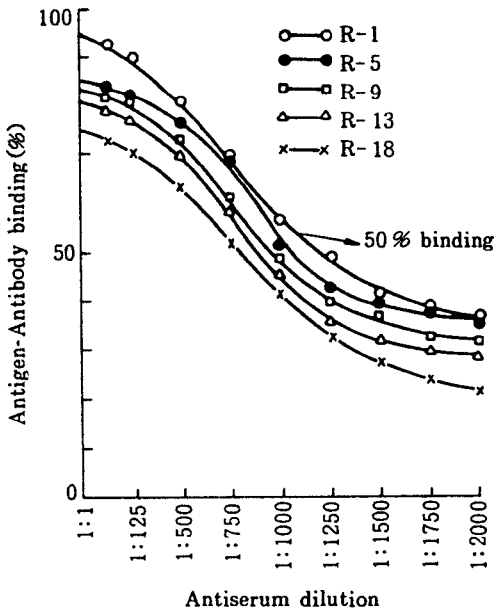


Fig. 1. Determination of antigen-binding activity (titer) of rabbit antiserum raised against ABA. R-1, R-5, R-9, R-13 and R-18 represent antisera from different rabbits.

2) 抗原-抗體反應時間

ABA 分析을 위한 抗原-抗體 反應液을 4°C에서 各各 다른 時間 동안 解置시키면서 最高의 抗原-抗體 結合率을 가져오는 時間을 檢索하였다.

그림 2에서와 같이 抗原-抗體 結合은 解置 初期

에는 解置時間에 比例하여 增加되다가 1時間 30分에 이르러 最高에 達하고 그 以後는 增加하지 않았다.

한편 結合率에 미치는 溫度의 영향도 調査하였는데 4°C가 가장 適合하였다(데이터 생략).

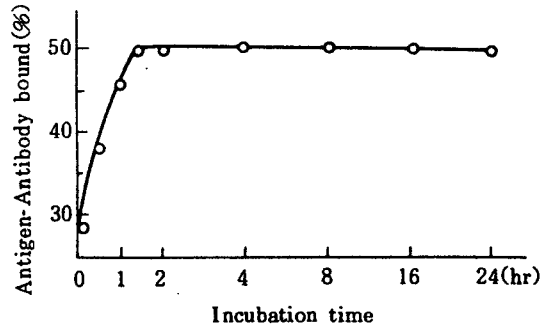


Fig. 2. Antigen-antibody binding reaction as a function of incubation time.

3) 抗原-抗體의 分離

여러 가지 抗原-抗體 分離方法 중에서 本實驗에서는 dextran-coated charcoal 方法을 利用하였다. 그림 3에 表示한 바와 같이 試驗管當 加하는 dextran-coated charcoal 量에 따른 遊離 抗原의 charcoal 結合率은 1,600 μ g 以上の charcoal에서 最高의 結合率을 나타냈다. 以下の 實驗에서는 1,600 μ g/tube를 使用했다.

4) ABA 定量 標準曲線

여러 濃度(0.5~14p mol)의 ABA存在下에 一定量의 3 H-ABA(50,000 dpm)가 1:1,150 力價의 抗 ABA

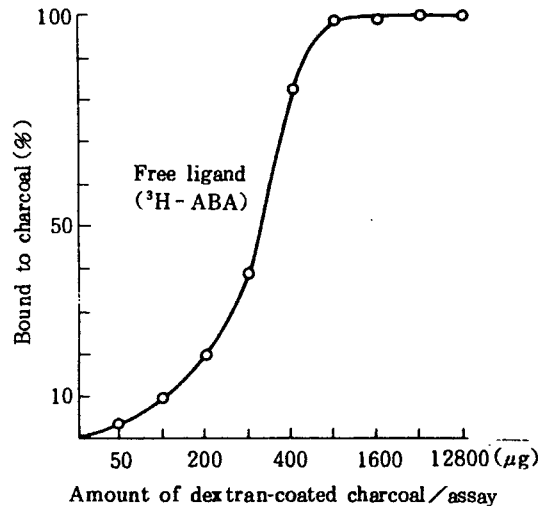


Fig. 3. Binding of free ABA to charcoal as a function of charcoal amount added per assay tube.

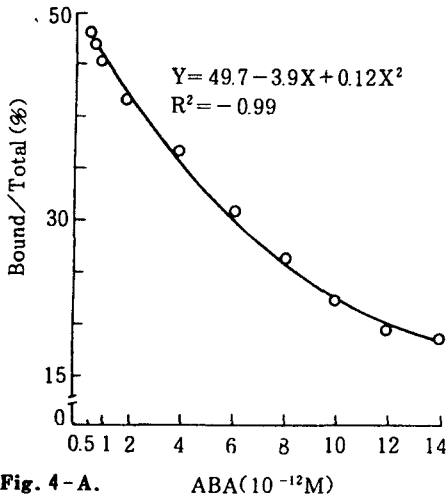


Fig. 4-A. ABA(10⁻¹²M)

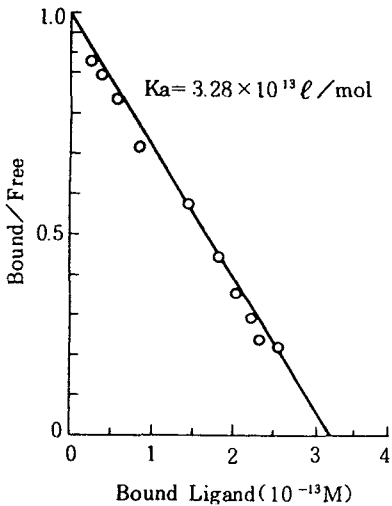


Fig. 4-B. Standard curve and corresponding Scatchard plot.

血清과 결합하는 率(B/T)을 測定하고 이를 ABA 濃度에 대하여 plot한 標準曲線을 그림 4-A에 表示하고 이로부터 計算하여 作圖한 Scatchard plot를 그림 4-B에 表示하였다. 여기서 얻어진 標準曲線은 $Y = 49.7 - 3.9X + 0.12X^2$ 式으로 表示되고 이 式의 실제 標準曲線에 대한 相關係數는 $R^2 = -0.99$ 이었기 때문에 이 式에 따라 ABA 濃度(X)를 Y 값(B/T) 으로부터 求할 수가 있었다.

Scatchard plot로부터 求한 抗體의 ABA에 대한 結合定數(association constant, k_a)와 ABA 結合容量(binding capacity)은 各各 $3.28 \times 10^{13} \text{ l/mol}$ 과 $3.2 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1}$ 이었다. 따라서 本 研究에서 開發한 抗 ABA 血清은 ABA에 대하여 親和性이 아주 높은 것임

Table 1. Cross reactivity of antisera against abscisic acid.

Compound	cross reactivity(%)
(±)cis-trans ABA	100
(+)cis-trans ABA	85.5
ABA mixed isomer	25.7
ABA methyl ester	126
Phaseic acid	0.82
dihydrophaseic acid	0.5
xanthoxin	0.0
farnisol, mixed isomer	0.1
M ₁ (Phaseic acid)	0.4
M ₂ (dihydrophaseic acid)	0.18

을 알 수 있었다.

5) 抗體의 特異性

抗血清은 여러 ABA類似 物質에 대한 反應性을 알아보기 위해서 ABA와 分子構造上 또는 生理的으로 類似하거나 關聯되는 여러 物質을 택하여 이들의 抗體에 대한 交叉反應(cross reactivity)을 관찰하였다.

表 1에 表示한 바와 같이 抗原으로 使用한 (±)-ABA의 反應度를 100%로 했을 때 (+)-ABA는 85.5% 그리고 ABA-methyl ester는 126%의 交叉反應을 나타냈다. 그러나 phaseic acid(PA)나 dihydrophaseic acid(DPA) 등 代謝物質 등은 1% 미만의 낮은 交叉反應을 보였다.

考 察

ABA의 分析은 높은 力價를 가진 抗血清을 얻음으로써 이루어질 수 있었다. 抗原-抗體의 50% 結合을 가져오는 抗體力價는 1 : 1,150이였으므로 本實驗에서는 1 : 1,150 비율 抗體로 分析하였다. Weiler¹⁴⁾는 1 : 1,350 비율을 使用하였는데 이는 30% 結合能을 가진 것이었고 Pengelly¹⁰⁾의 경우 1 : 40 비율의 抗體를 使用하고 있어서 本實驗에서 使用된 抗體가 더 예민한 것으로 나타났다.

(±)-ABA 抗原에 대한 抗血清은 ABA에 대해서 높은 特異性을 나타냈다. 植物體에는 (+)-ABA만이 含有되어 있는 것으로 알려지고 있는데 本實驗에서 使用한 抗體는 (+)-ABA에 85.5%의 높은 交叉反應을 나타내고 있기 때문에 本 抗體에 의한 實測은 85%가 (+)-ABA일 것임이 示唆되었다. 또한 本 抗血清은 特異性이 높기 때문에 抽出溶媒로 抽出한 試料 ABA는 精製하지 않고도 分析이 가능했다.

ABA-methyl ester에 126%의 交叉反應을 나타낸 것은 (±)-ABA의 C₁-carboxy基에 HSA를 conjugate시켰기 때문인 것으로 示唆된다. Weiler도 C₁-carboxy基에 conjugate시켰을 때 ABA-ester에 높은 交叉反應을 보였다고 하며 Walton¹³⁾은 ABA의 4'-keto基에 Bovine serum albumin(BSA)을 conjugate시켰을 때 遊離 ABA에 選擇的으로 反應했다고 밝혔다.

測定範圍에 있어서 Weiler^{14, 15)}는 0.2-30p mol까지였으나 本 實驗에서는 0.5-14p mol까지 한계로서 더 精確한 分析을 할 수가 있었다.

RIA에 있어서 成敗를 좌우하는 것이 遊離抗原과 抗體結合抗原 分離의 精確성 여부에 달렸다는 것은 周知의 事實이다. Weiler 등은 黃酸암모늄을 이용한 salt precipitation method를 使用하고 있는데, 本 實驗에서도 이 方法의 도입을 시도했으나 측정치의 부정확으로 이 方法을 이용하지 못하고 dextran-charcoal의 1600μg/tube 첨가에 의해서 99.2% 이상 精確하게 分離함으로써 精確분석이 가능했다. Felber³⁾도 黃酸암모늄은 時間的 제약이 없는 장점이 있으나 測定值의 不正確으로 별로 사용되지 못하고 있다고 말하고 있어 著者と 一致된 見解를 보이고 있다.

1個 試料의 分析에 소요되는 時間은 Weiler는 3시간 정도, Pengelley¹⁰⁾는 IAA-RIA에서 24시간 이상 그리고 Walton은 ABA-RIA에서 20시간 정도 소요 되었으나 本 實驗에서는 2時間이면 충분했다.

以上과 같이 本 研究에서 開發한 ABA에 대한 RIA는 精製하지 않고도 精確한 分析이 가능했고 1인이 하루 수백개의 試料를 分析處理할 수 있었다.

摘 要

Abcsin酸(ABA)의 定量分析을 위한 放射免疫 測定法을 開發하였다.

(±)-ABA를 사람血清 albumin에 conjugate 시킨 抗原을 만들고 이를 家兔에 接種하여 얻은 抗血清은 ABA에 대하여 높은 親和性을 나타냈다($K_a = 3.28 \times 10^{13} \ell/mol$).

³H-ABA를 追跡子로 使用하고 dextran-coated charcoal을 遊離 ABA와 抗體結合 ABA의 分離에 使用한 本 放射免疫測定法은 ABA를 0.5×10^{-12} mol 까지 測定할 수 있었고 測定範圍는 14×10^{-12} mol 까지 包含되었다. 이 免疫測定法은 特異性이 높기 때문에 分析前 試料로부터 ABA를 미리 精製할 필요가 없었

다.

試料 1個의 分析에는 2時間 정도 소요되어 하루 수백개의 試料를 分析처리할 수 있었다.

引 用 文 獻

1. Bangerth, F. 1982. Changes in the ratio of cis-trans to trans-trans abscisic acid during ripening of apple fruits. *Planta* 155: 199-203.
2. Catt, K. and Tergear, G. W. 1967. Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science* 158:1570-1572.
3. Felber, J. P. 1974. Radioimmunoassay of polypeptide hormones and enzymes in Methods of biochem. analy. 122:1-94. interscience.
4. Fuchs, Y. and Mayak, S. 1972. Detection and quantitative determination of abscisic acid by immunological assay. *Planta* 103: 117-125.
5. Hayashi, M. and Himeno, M. 1973. Studies on the dormancy and germination of rice seed. II. Relation between seed dormancy and growth substances in rice. *Jap. J. Tro. Agr.* 16(4):270-275.
6. Ho, D. T. and Varner, J. E. 1976. Response of barley aleurone layers to abscisic acid. *Plant physiol.* 57:175-178.
7. Ketring, D. L. and Morgan, P. W. 1970. Physiology of oil seeds. I. Regulation of dormancy in virginia-type peanut seed. *Plant physiol.* 45:268-273.
8. Kochhar, T. S. 1983. Interaction of abscisic acid and Kinetin on growth of haworthia callus in vitro. *Experimtia/switzerland* 39: 780-781.
9. Liu, W. C. and Carns, H. R. 1961. Isolation of abscisic acid, an abscisic acid accelerating substance. *Science* 134:384-385.
10. Pengelley, W. 1977. A specific Radioimmunoassay for nanogram quantities of auxin, indole-3-acetic acid. *Planta* 136:173-180.
11. Rajasekaran, K., Vine, J. and Mullins, M. G. 1982. Dormancy in somatic embryos and seeds of vitis: Changes in endogenous abscisic acid.

- sic acid during embryogeny and germination. *Planta* 154:139-144.
12. Rivier, L., Milon, H. and Pilet, P. E. 1977. Gas chromatography-mass spectrometric determinations of abscisic acid levels in the cap and the apex of maize roots. *Planta* 134: 23-27.
 13. Walton, D. C., Dashek, W. and Galson, E. 1979. Radioimmunoassay for abscisic acid. *Planta* 146:139-145.
 14. Weiler, E. W. 1979. Radioimmunoassay for the determination of free and conjugated abscisic acid. *Planta* 144:255-263.
 15. Weiler, E. W. 1980. Radioimmunoassay for the differential and direct analysis of free and conjugated abscisic acid in plant extracts. *Planta* 148:262-272.
 16. Yalow, R. S. and Berson, S. A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 38:1157-1175.
 17. Zeevaart, J. A. D. and Milborrow, B. V. 1976. Metabolism of abscisic acid the occurrence of epi-dihydrophaseic acid in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 15:493-500.