

# 异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)的间接酶联免疫吸附测定法

段留生<sup>①</sup> 田晓莉 白崧 吴琦 何钟佩  
(作物化学控制研究室)

**摘要** 以 iPA-BSA 为免疫抗原制备了兔抗血清,与其它 iPA 类似物的交叉反应率均低于 5%,抗体-抗原亲和常数为  $6.26 \times 10^6 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。利用此抗体与生物素-亲和素标记(ABC)系统建立了 iPA 的间接酶联免疫吸附测定法,检测线性范围为  $0.8 \sim 1\,000 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $2.4 \sim 5\,693 \text{pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),板内误差  $CV < 5\%$ ,板间误差  $CV < 10\%$ ,样品平均回收率为 87.3%。经平行试验、稀释试验以及对棉花根系伤流液、侧根组织和叶片中 iPA 含量的测定,表明所建立的 ELISA 及样品提取方法是可靠的。

**关键词** 异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA); 酶联免疫吸附测定; 生物素-亲和素标记系统

**中图分类号** Q946.885.4; Q511

## Establishment of an Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Isopentenyl Adenosine

Duan Liusheng Tian XiaoLi Bai Song Wu Qi He Zhongpei  
(Lab. of Crop Chemical Control, CAU)

**Abstract** The indirect enzyme-linked immunosorbent assay for isopentenyl adenosine (iPA) was established using rabbit antiserum against iPA-BSA and antirabbit IgG-Biotin-Avidin-HRP labeling system. Association constant between antigen and antiserum was  $6.26 \times 10^6 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$  and all the cross reactivity value of antiserum with iPA similar compound were lower than 5%. The linear assay range of the method was  $0.8 \sim 1\,000 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Variation within plate was less than 5%, and variation among plates was less than 10%. Average recovery rate of added standard in sample was 87.3%. Some experiments was operated for quality control in practical assays. The contents of iPA in root bleedings, lateral roots and leaves of cotton plant were measured using this method.

**Key words** isopentenyl adenosine(iPA); enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA); biotin-avidin labeling system

异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)是一种重要的细胞分裂素,其免疫学测定方法较多用放射免疫法<sup>[1,2]</sup>进行。Erust D 等<sup>[3]</sup>、Vonk CK 等<sup>[4]</sup>、Badenoch JJ 等<sup>[5]</sup>分别报道了 iPA 的酶联免

收稿日期: 1996-06-30

①段留生,北京市海淀区圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

疫测定法, Wang TL 等<sup>[6]</sup>制备得到了 iPA 的单克隆抗体, 并用于 iPA 竞争性荧光酶联免疫分析(F-ELISA), 检测限达 10 pg。国内目前已建立了玉米素核苷组(Z+ZR)<sup>[7,8]</sup>、二氢玉米素核苷组(DHZ+DHZR)<sup>[9]</sup>的 ELISA 方法, iPA 的 ELISA 测定方法则未见报道。生物素-亲和素系统(ABC)具有高度亲和性和专一性, 用于免疫学测定可以提高检测的灵敏度和稳定性, 用于 iPA 的 ELISA 测定尚未见报道。

本文报道了以 iPA-BSA(牛血清白蛋白)为免疫抗原制备免抗血清, 以 iPA-OVA(鸡卵清白蛋白)为包被抗原, 利用生物素-亲和素标记系统代替了酶标二抗的间接酶联免疫吸附测定方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

异戊烯基腺嘌呤核苷(iPA)、异戊烯基腺嘌呤(iP)、二氢玉米素(DHZ)、二氢玉米素核苷(DHZR)、玉米素(Z)、玉米素核苷(ZR)、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司; 激动素(KT)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、鸡卵清白蛋白(OVA)均购自上海生物化学研究所; 生物素标记的羊抗兔抗体与亲和素标记的辣根过氧化物酶购自中国军事医学科学院; 其余试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 免疫抗原和包被抗原制备

参照徐如涓等<sup>[7]</sup>的方法。免疫抗原以 BSA 为载体, 包被抗原以 OVA 为载体, iPA 与 BSA, OVA 的质量比均为 1:10。对合成抗原用岛津 uv-190 紫外分光光度计进行紫外扫描鉴定, 光程 1 cm。

### 1.3 抗血清制备

选用 3 月龄, 体重 2 kg 左右的雄性新西兰大白兔进行免疫。免疫程序如下: 初免采用背部皮内多点注射, 隔 5 d 进行一次, iPA-BSA 用量分别为 0.3 mg, 0.3 mg 和 0.15 mg, 分别加等体积完全福氏佐剂充分乳化。加强免疫采用 iPA-BSA 0.3 mg 静脉注射, 同时用 0.1 mg iPA-BSA 进行肌肉注射, 均加等体积不完全福氏佐剂乳化。加强免疫 5 d 后耳缘静脉采血, 用间接 ELISA 法验血。验血合格后, 心脏穿刺取血, 静置收集血清, 用 33% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀 3 次, 对磷酸缓冲液(PBS)充分透析后, 加一倍甘油于 -20℃ 下保存。

### 1.4 抗体亲和常数的测定

配制系列浓度 iPA 标准溶液, 与一定稀释度的抗血清等体积混合, 室温下温育 2 h, 加入到 iPA-OVA 包被过的酶标板内(100 μL·孔<sup>-1</sup>); 15 min 后甩干, 洗涤 3 次, 加生物素-羊抗兔 IgG 溶液(100 μL·孔<sup>-1</sup>), 37℃ 下温育 0.5 h; 洗涤 3 次, 甩干, 再加亲和素-辣根过氧化物酶溶液(μL·孔<sup>-1</sup>), 37℃ 下温育 0.5 h; 洗涤 5 次, 加底物显色; 终止比色。计算方法参见张军等<sup>[4]</sup>。

### 1.5 ELISA 操作步骤和标准曲线制作

①包被: 包被抗原用 50 mmol·L<sup>-1</sup> 碳酸盐缓冲液(pH9.6)按一定比例稀释后, 每孔加 100 μL, 4℃ 保湿过夜。

②竞争: 用 10 mmol·L<sup>-1</sup> PBST(含 4% NaCl 和 0.1% Tween-20 的磷酸盐缓冲液, pH7.5)

洗板 3 次,甩干。每孔加入用 PBSTG(含 0.1% Tween-20, 0.1% 明胶的磷酸盐缓冲液)稀释的系列标准溶液或待测样品 50  $\mu\text{L}$ , 再加入用 PBSTG 稀释的抗血清,混匀后 28 $^{\circ}\text{C}$  温育 3~4 h。

③洗板 3 次,加入 PBSTG 稀释的生物素-羊抗兔 IgG(每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 0.5 h。

④洗板 3 次,加入 PBSTG 稀释的亲合素-辣根过氧化物酶(每孔 100  $\mu\text{L}$ ), 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 0.5 h。

⑤显色:洗板 5 次,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  底物溶液(pH5.0 的 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸缓冲液,含邻苯二胺 2 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.01%), 室温下显色。

⑥终止:用 3 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸溶液(每孔 50  $\mu\text{L}$ )。

⑦比色:在酶标仪上读取波长 492 nm 处的 OD 值。

⑧换算和制作标准曲线:以标准溶液浓度的对数  $\ln C$  为横坐标,以

$$\text{logit}(B/B_0) = \ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0} = \frac{B}{B_0 - B} \text{ 为纵坐标,做标准曲线或线性回归。}$$

( $B$  为测定样品比色值,  $B_0$  为 0 孔比色值,  $C$  为相应的 iPA 浓度)

## 1.6 交叉反应值测定

以 iPA 类似物代替 iPA 作标准曲线, 求出  $B/B_0$  为 50% 时标准物浓度, 则交叉反应值计算如下:

$$\text{交叉反应值} = \frac{B/B_0 \text{ 为 } 0.5 \text{ 时 iPA 浓度}}{B/B_0 \text{ 为 } 0.5 \text{ 时 iPA 类似物浓度}} \times 100\%$$

## 1.7 样品提取方法

取新鲜植物样品 1.0 g 于液氮中速冻, 用 80% 甲醇(含 1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$  二叔丁基对甲苯酚)匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$  提取 8 h, 4 000 rpm 离心 15 min; 残渣用 80% 甲醇再重复提取 2 次。3 次共用提取液 5 mL, 合并上清液, 氮气吹干, 用 PBSTG 溶解定容, 即为样品粗提液, 直接或经必要的纯化后用于 ELISA 测定。

## 1.8 质量控制试验

稀释试验: 将同一份样品按 1, 2, 4, 8 倍稀释, 分析测定结果的倍性关系。

回收率试验: 把一定量的 iPA 标样加入植物样品, 并与样品同步提取, 按测定结果计算回收率。

# 2 结果与讨论

## 2.1 抗原合成的检测

如图 1 所示, 合成的免疫抗原 iPA-BSA 和包被抗原 iPA-OVA 的紫外吸收图谱具有 iPA 和相应蛋白质图谱的加合形状, 表明交联是成功的。经计算, iPA 和 BSA 的交联比是 5.93, 一般认为交联比在 2~45 之间均可产生免疫反应。

## 2.2 抗血清稀释度曲线

分别免疫 3 只兔子, 所得到抗血清的稀释度曲线类似, 最高稀释度达 50 000 以上, 工作稀释度为 4 000~8 000, 表明免疫效果良好。

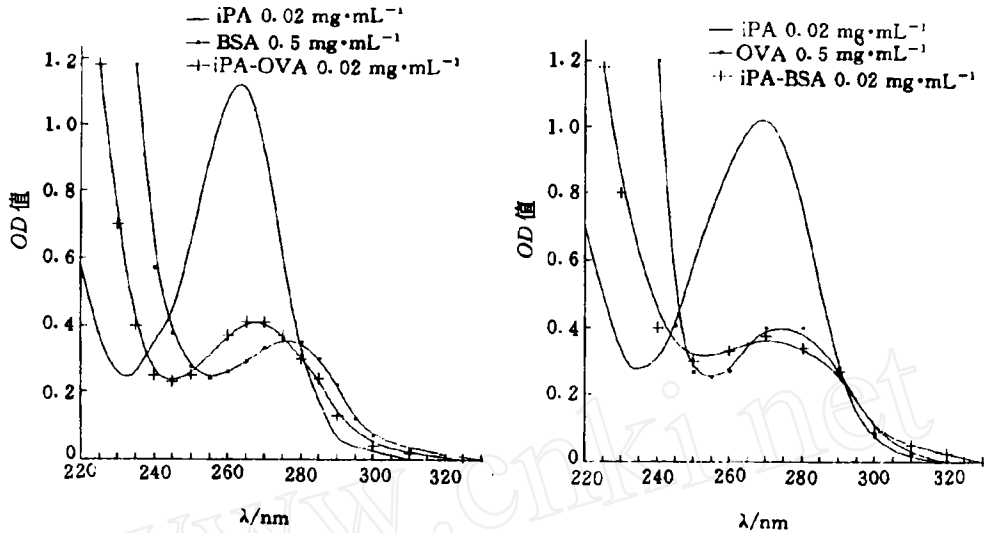


图1 iPA-BSA 和 iPA-OVA 的紫外扫描图谱

### 2.3 抗原-抗体亲和常数

以  $-V/a$  为因变量  $y$ , 以  $V$  为自变量  $x$ , 进行线性回归, 得方程为  $y = 6.23 \times 10^6 - 6.28 \times 10^6 x$ ,  $r = -0.989$ , 相关达极显著水平。计算得抗血清和抗原的亲合常数为  $6.26 \times 10^6 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 与文献报道值相比这是较低的, 可能原因是 iPA-N-BSA 复合物中 iPA 和 BSA 间缺乏长的间隔, 也可能是免疫剂量过大而致。这可能会导致检测灵敏度的下降, 本实验中通过适当提高抗体稀释度和适当延长竞争等步骤的平衡时间来解决。

### 2.4 iPA 标准曲线

用系列浓度的 iPA 制作的 ELISA 标准曲线如图 2,  $\log_{10} B/B_0$

与  $\ln C$  存在显著的直线相关关系, 相关系数达  $-0.999$  以上。检测的线性范围为  $0.8 \sim 1000 \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.5 抗血清与 iPA 类似物的交叉反应

表 1 列出了所制备抗血清和一些 iPA 类似物的交叉反应值, 除与 iP 交叉反应值为  $3.7\%$

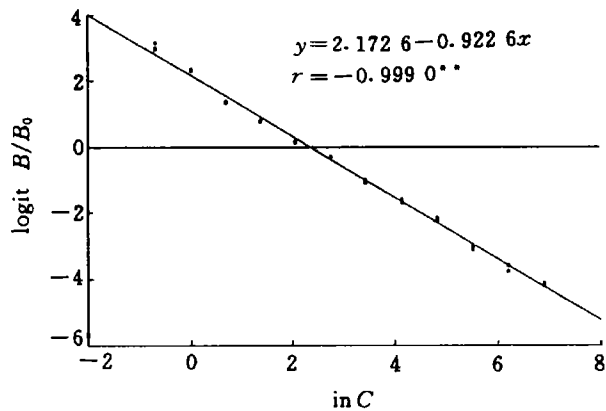


图2 ELISA 标准曲线

外,其余均很低,与文献报道值相比也是较低的,表明抗血清对 iPA 识别的专一性较高。

表 1 抗血清和一些 iPA 类似物的交叉反应

化合物	50%抑制浓度/ng·mL <sup>-1</sup>	交叉反应值/%	文献 <sup>[6]</sup> 报道值/%
iPA	171.1	100.00	100.00
iP	4 675.2	3.70	19.40
DHZR	39 615.2	0.43	1.61
DHZ	49 706.3	0.34	0.21
ZR	8 537.3	2.00	2.60
Z	59 361.0	0.29	0.43
6-BA	13 319.0	1.30	5.00
KT	>7 232 331	<0.074	2.60

## 2.6 质量控制试验

**2.6.1 板间和板内的重复性** 本实验选用天津有机塑料试验厂生产的 96 孔酶标板,进行板间和板内重复性试验。同一样品在同一块板上不同孔间变异为 3.33%~4.55%,低于文献报道值 5%;板间变异小于 9.60%,也小于文献报道值,表明重复性较好。板间和板内差异很大程度上与酶标板的质量和操作者加样的准确度和重复性有关。通过试验选择优质的酶标板和样品测定前熟练操作方法是很有必要的。

**2.6.2 稀释试验** 用棉叶粗提液稀释 1,2,4,8 倍后,测得 iPA 浓度分别为 418.5±10.4, 210.4±7.7, 108.8±9.6, 56.0±6.5 ng·g<sup>-1</sup>(FW),倍性符合度在 85%以上,表明测定结果专一可靠。

**2.6.3 回收率试验** 未添加 iPA 的棉叶样品检测值为 49.5±4.1 ng·g<sup>-1</sup>(FW),样品中分别添加 iPA 250, 500, 1 000 ng·g<sup>-1</sup>(FW),检测值分别为 270.3±5.0, 486.8±3.4, 910.5±8.6 ng·g<sup>-1</sup>(FW),添加回收率分别为 88.32%,87.46%和 86.10%,平均达到 85%以上,表明样品提取方法和测定结果是可信的。

## 2.7 植物样品的 iPA 含量测定

应用所建立的 iPA-ELISA 方法测定了棉花根系伤流、侧根组织、叶片等样品中的 iPA 含量,结果如表 2。

表 2 棉株样品中的 iPA 含量

样品名称	蕾期(07-05)	集中结铃期(08-15)	结铃后期(09-10)
侧根组织/ng·g <sup>-1</sup> (FW)	—	1 300.0	500.5
根系伤流/ng·plant <sup>-1</sup> (12h)	40.0	275.0	50.0
功能叶片/ng·g <sup>-1</sup> (FW)	47.1	225.2	103.5

—: 为未测定

有报道认为,iPA是根系向地上部运输的细胞分裂素的重要形式<sup>[10]</sup>,从本测定结果来看,随棉株生育进程,侧根组织中iPA下降,表明根系合成或运输转化能力下降。根系伤流中iPA在集中结铃期最高,表明根系运输iPA的能力最高,而叶片中iPA含量与根系伤流中iPA呈正相关。本实验结果为iPA作为根冠间运输的CTKs形式提供了证据。

### 参 考 文 献

- 1 周燮,徐义俊. 植物生长调节剂免疫检测技术的研究进展. 南京农业大学学报,1987,(2):9~14
- 2 Khan S A, Humayun M Z, Jacob T M. A sensitive radioimmunoassay for isopentenyl adenosine. *Ann Bio*, 1977, 83:632~635
- 3 Erust D. Isolation and quantification of isopentenyl adenosine and arise cell culture by single for monitoring radioimmunoassay and bioassay. *Planta*, 1983,159:216~221
- 4 Vonk C R, Davelaar E, Rilot S A. The role of cytokinins in relation to flowers-bud blasting in *Iris CV*. Ideal: cytokinins determination by an improved enzyme-linked immuno sorbent assay. *Plant Growth Regul*, 1986,4:65~75
- 5 Badenoch J J, Parker C W, Letham D S, et al. Use of isopentenyl adenosine and dihydro zeatin riboside antibodies for the quantification of cytokinins. *J Plant Growth Regul*, 1987, 6:159~182
- 6 Wang T L. Monoclonal antibodies for the analysis and purification of isopentenyl adenosine cytokinins. *Phytochemistry*, 1987,26(9):2447~2452
- 7 徐如涓,季本仁,段金玉. 玉米素核苷的酶标免疫测定法. 云南植物研究, 1986,8(3):333~342
- 8 张军,何钟佩,吴铤. 玉米素核苷间接酶联免疫吸附测定法的建立. 北京农业大学学报,1991,17(增刊):145~148
- 9 陈以峰,张锡金,周燮. 二氢玉米素核苷组的间接酶联免疫吸附测定法. 南京农业大学学报,1992,15(2):122
- 10 丁静. 棉株根系伤流中的细胞分裂素类物质. 植物生理学报, 1985,11(3):249~259