

インドール酢酸・ジベレリンおよびアブシジン酸のELISAによる検出と定量

松本亮司・奥代直巳・久原重松・村田広野 (果樹試験場口之津支場)

MATSUMOTO, R., N. OKUDAI, S. KUHARA, H. MURATA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Quantitative Analysis of IAA, GA and ABA

近年, Weilerら (1981, 1982) により一連の植物ホルモンの抗血清による測定法について報告がなされている。インドール酢酸, ジベレリンおよびアブシジン酸についてイムノアッセイを試みたので, その概要について報告する。

1. 試験方法

1) 抗原と抗血清の作成

インドール酢酸 (IAA), ジベレリン (GA), アブシジン酸 (ABA) の3つのホルモンは共通してカルボキシル基を有している。この基と牛血清アルブミン (BSA) のアミノ基をペプチド結合させた。これらのホルモン-BSA 結合体を生後6カ月の家兎にアジュバントを加えて注射した。試採血で抗血清ができたと確認された個体から全採血により血清をえた。抗血清は真空凍結乾燥し保存したが, 一部については, ただちに飽和硫酸法により, γ グロブリンの画分 (IgG) をえた。

2) 標識酵素とホルモンとの結合

牛小腸のアルカリ性フォスファターゼのアミノ基とこれら3つのホルモンのカルボキシル基をカルボジイミド法により結合, 作成した。ただし, Weilerら (1981, 1982) による1:1のモル比に加え, 1:20のモル比でも反応させた。

3) ELISAによる植物ホルモンの検出

IgGを1~10ppmの濃度で, ビニールプレートにウェル当たり0.2mlづつ注入し, 37℃, 5時間のコーティング処理を行った。被検液は0.5% DMFに溶解させた1,000ppm液を原液とし, PBS-Tweenで所定濃度に希釈調製した。検出方法は競合法によった。コーティングしたビニールプレートの各ウェルに, サンプル0.1mlと標識酵素とホルモンの結合体 (Conjugate) 0.1mlを注入し, 37℃, 3時間のインキュベーションを行った。その後, PBS-

Tweenで洗浄, 乾燥させたプレートに, 基質であるP-ニトロフェニールリン酸二ナトリウム (1mg/ml) 液を0.2ml注入し, 発色させた。発色程度は405nmの吸光度を分光光度計により測定した。

2. 試験結果および考察

第1表に抗原の注射の回数と抗体の生成について示した。Weilerらの報告では, この部分の記載がほとんど欠除しており, 当初はウィルスの抗体が生成する程度の回数の注射を第1回目として試みた。その結果, 抗体は生成しなかった。2回目は表にあるように, かなりの回数の注射によりようやく抗体が生成した。3回目は抗原の違いによるのか, 家兎の個体差によるのかは不明であるが, IAAとGAは10ng, ABAは100pgまで測定可能な抗血清がえられた。抗体の生成には家兎の個体差も大きく影響し, 従来言われているとおり, 1抗原について5頭は試みる必要があると思われる。なお, ウィルスや酵素等の純粋なタンパクとは異なり, BSAとこれら低分子のホルモン等のハプテンを結合させたものは抗体が生成しがたく, 注射回数を多く試みる必要を認めた。

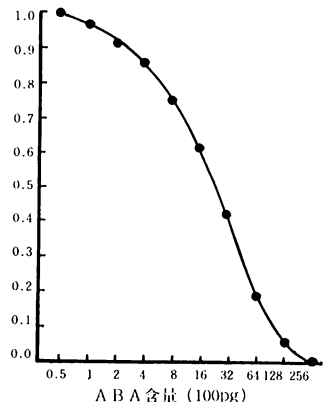
なお, Weilerらによる1:1のモル比によるconjugateを使用した場合は, 発色がかなり遅く, 早くするには希釈倍率も低くなり, 1点当たりの経費も高くなり, 実用的ではなかった。1:20のモル比により作製したconjugateを使用した場合, 発色も早く, 500倍から1,000倍の濃度で使用でき, 1点当たりの経費も安価になり実用に耐えるものとなった。

以上の方法より, IAAについては 10^{-5} gから 2.5×10^{-8} gまで, GAは 10^{-5} gから 10^{-7} gまで, ABAは 10^{-6} gから 10^{-10} gまで容易に検出することができた。

第1表 抗原の処理期間と抗体の生成

試行	回数	抗原	処理期間	抗体の生成
1回目	2頭	IAA-BSA	S57年, 6/18(2, 静)-7/2(2, 静)-7/16(3, 静)-7/27(採血)	未生成
2回目	1頭	IAA-BSA	S57年, 10/15(1, 静)-10/28(1, 静)-11/16(1, 静)-12/3(1, 静)-12/18(1, 静)-12/29(1, 静)-1/13(1, 静)-1/21(1, 静)-2/8(1, 静)-2/20(1, 静)-3/2(採血)	生成, 2.5ng lで検出
		IAA-BSA	S58年, 2/26(1, 静)-3/15(1, 静)-3/30(1, 静)-4/13(1, 静)-4/26(8, 静)-5/7(採血)	生成, 10ng lで検出
3回目	5頭	GA-BSA No 1	S58年, 2/26(2, 静)-3/15(2, 静)-3/30(2, 静)-4/13(2, 静)-4/26(1, 静)-5/7(採血)	生成, 10ng lで検出
		GA-BSA No 2	S58年, 2/26-4/26(No 1と同じ), 5/12(8, 静)-5/21(2, 静)-6/10(1, 静)-6/23(1, 静)-7/8(採血)	生成, 100ng lで検出
		ABA-BSA No 1	同上, 但し5/12のみ4mg	生成, 10ng lで検出
		ABA-BSA No 2	S58年, 2/26(2, 静)-3/15(2, 静)-3/30(2, 静)-4/13(2, 静)-4/26(1, 静)-5/12(1, 静)-5/26(採血)	生成, 100pg lで検出

(注) 期間の項: 月日, () 内の数字は注入した調製抗原の量 (mg), 静はアジュバントを加えた皮下及び筋内注射, 静は静脈注射を示す。



第1図 競合的ELISAによるABAの検出曲線