

## 酵素免疫學的 方法에 의한 植物호르몬 分析

盧 基 安\*

### Enzyme-linked Immunosorbent Assay of Plant Hormones

Ki An Noh\*

#### ABSTRACT

In spite of the development of highly sophisticated instrument, the precise quantitation of plant hormones still has many difficulties. Due to their high specificity, sensitivity and minimal sample purification steps, immunological assays have been widely applied for plant hormone assay. Enzyme-linked immunosorbent assay technique for the determination of plant hormones was developed by Voller in 1978. Immunological assays are accomplished by competition of labeled tracer antigen and unlabeled antigen for a limited number of specific antibodies. The use of enzyme as replacement labels for radioisotopes enabled much of the sensitivity and specificity of radioimmunoassay (RIA) to be retained but without the inherent disadvantage of high capital cost, potential health hazard, and short shelf life of the labeled reactants.

Key words : EIA, RIA, plant hormone, immunological assays.

#### 緒 言

Plant Hormone의 분석은 식물체로부터의 추출, 추출물질중의 분석저해물질을 제거하는 정제, 이어서 정량의 과정으로 이루어지며 분석방법으로는 생물검정법(bioassay)이나 물리-화학적인 방법들이 일반적으로 사용되어 왔다.

그러나 이와 같은 방법들은 추출과정중의 손실(loss), 생물검정법의 low precision, 물리-화학적 분석법의 low sensitivity, 그리고 많은 시간과 시약들이 소요되는 단점을 가지고 있다.

이와 같은 생물검정법이나 물리-화학적 분석법의 문제점을 극복하기 위하여 Fuchs and coworkers는 1971년 동물의 면역작용을 이용한 immunoassay를 처음으로 개발하였다. 그러나 이의 응용은 매우 한정적이었으며 sensitivity도 아주 낮았다.

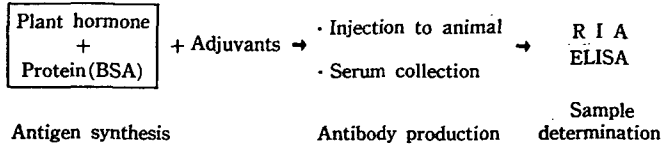
1976년 Weiler and Zenk는 Berson and Yalow(1959)에 의해서 개발되어 임상적으로 사용되어 오던 Radioimmunoassay(RIA)를 식물 호르몬 분석에 도입함으로써 고도로 Sensitive하고 Specific한 분석이 가능하게 되었다. 그러나 RIA는 고가의 장비가 필요하며, 방사선 물질의 짧은 반감기, 취급시의 위험성 및 폐기물 처리의 어려움과 같은 또 다른 문제점을 가지고 있다. 1978년 Voller는 효소를 이용한 면역학적 분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay)을 개발 이와 같은 문제점들을 극복하면서 Sensitive하고 Specific한 분석이 가능하게 됨으로써 식물호르몬 분석법으로 널리 이용되고 있다.

본 review의 목적은 Enzyme-linked immunosorbent assay에 의한 식물 호르몬 분석에 필요한 기초지식과 방법들을 제시코져 한다.

\* 農業技術研究所 營養生理課 Institute of Agricultural Science, R.D.A., Suwon 440-100, Korea.

## 遂行方法

Immunoassay 에 의한 식물 호르몬의 분석은 크



### 1. Antigen 제조

#### 1) Antigen

면역학적 방법에 의한 식물 호르몬 분석의 성패여부는 우선적으로 immunogen 에 의해서 좌우되며 어떤 immunogen 이 동물 체내에서 면역작용을 양호하게 일으키기 위해서는 Molecular Weight (MW)가 10,000 이상이 되어야 한다.

Immunogen 은 MW의 크기에 따라서 antigen과 hapten 으로 구별된다. antigen 은 MW가 충분히 커서 단독으로도 동물체내에서 항체 생성을 유발시킬 수 있는 물질로 정의되는 반면 MW가 적어서 자체만으로는 antibody 생성을 유발시킬 수 없지만 protein 과 같이 MW가 큰 다른 물질과 결합된 형태로서 면역작용을 일으킬 수 있으며 이 결합체를 사용하여 만든 antibody 에 대해서는 특이 (specific) 하게 반응하는 물질을 hapten 이라고 정의한다. plant hormones 은 MW가 적어서 모두 hapten 에 속한다. 따라서 BSA와 같은 protein 과 결합된 형태로서만 antigen 으로 사용될 수 있다.

plant hormones 과 protein 과의 결합법은 여러 가지가 있지만 대개 plant hormones 내부의 carboxyl group 이나 alcohol group 을 통한 결합이 사용된다.

ABA, GAs, IAA 는 분자 구조내의 carboxyl group 과 protein 중의 free amino group (특히 lysine residue) 과의 peptide 결합을 많이 이용한다.<sup>10)</sup> 결합방법은 Mixed-Anhydride 법이나<sup>11,12)</sup> Carbodiimide 법<sup>14,17)</sup> 이 이용된다.

그러나 분자내에 carboxyl group 이 없는 cytokinins 의 zeatin 경우 zeatinriboside 를 사용한다. 이 때는 periodate cleavage 법<sup>6,9,13,15)</sup> 을 이용하여 당 분자를 산화적으로 깨어서 만든 di-alcohol group 과 protein 과의 결합이 형성된다. 그림 1 은 ABA와 protein 과의 합성과정을 나타내고 있으며 그림 2 와 3 은 각각 zeatinriboside 와 pr-

otein 과의 합성원리와 과정을 나타내고 있다.

#### 2) Adjuvants

Antigen 이 최고의 antibody 생산을 유발시키기 위해서는 동물 체내에서의 농도가 일정하게 유지되어야 한다. 이와 같은 조건을 만족시키기 위해서는 소량의 antigen 을 여러번 주사하거나 또는 어떤 물질과 함께 주사하여 체내에서의 용출이 서서히 일어나게 하는 2 가지 방법이 가능하며 후자와 같은 물질을 Adjuvants 라고 하며, antigen 과 함께 주사되어 동물의 면역작용을 크게 증대시키는 물질로 정의될 수 있다.

Adjuvant 는 mineral oil, 계면 활성제, 미생물의 시체로 구성되며 미생물 시체의 존재여부에 따라서 complete Adjuvant 와 incomplete Adjuvant

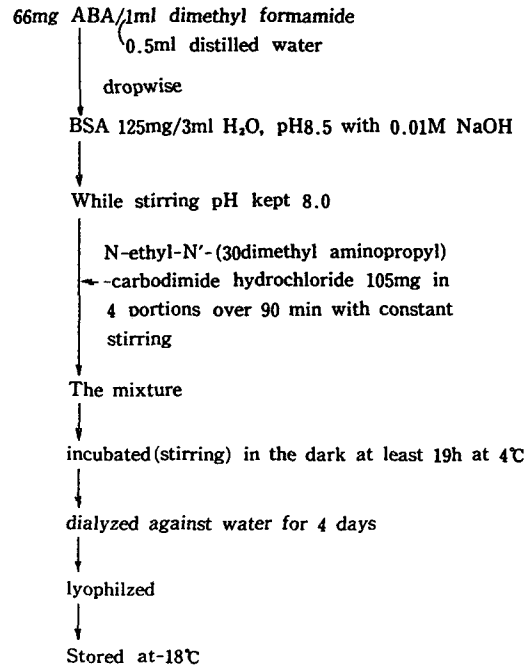
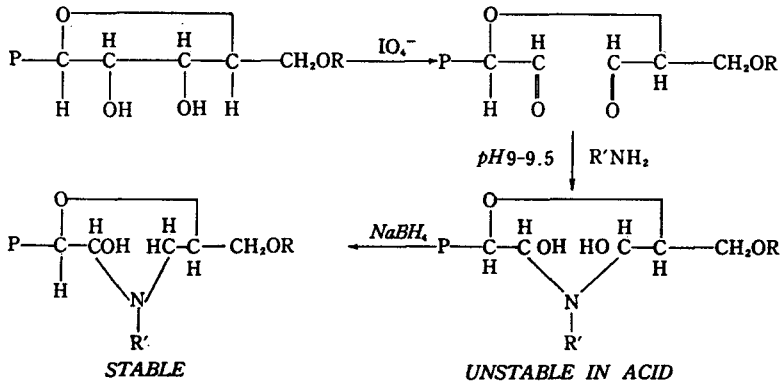


Fig. 1. The procedure of antigen synthesis of ABA



P: Purine or Pyrimidine

R: H or  $\begin{matrix} \text{P}-\text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$  OH

R': Protein backbone: ie the N is supplied by the lysine residues

Fig. 2. Conjugation of riboside (tide) to protein (Proc. Natl. Acad. Sci USA 52: 69)

ZR (10.3mg/1ml MeOH)  
 ↓  
 ← 5ml 0.01M NaIO<sub>3</sub> over a period of 7 min  
 ↓  
 Clear solution  
 ↓  
 Stir for 13 min  
 ↓  
 ← 0.3ml 0.1M ethyleneglycol (30 umol)  
 ↓  
 After 5 min  
 ↓  
 The mixture  
 ↓  
 added dropwise to a stirred solution of 100mg BSA  
 in 5ml water adjusted to pH 9.3 with 5% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 ↓  
 pH was kept between 9.2-9.4  
 ↓  
 after 60 min  
 ↓  
 ← Solid NaBH<sub>4</sub> 5mg  
 ↓  
 after 40 min  
 ↓  
 ← Solid NaBH<sub>4</sub> 5mg  
 ↓  
 after 40 min  
 ↓  
 pH was lowered to 6.5 with 1M acetic acid  
 ↓  
 Stirred for another 2h  
 ↓  
 Conjugate was purified by dialysis against water  
 (3 days at 4°C), lyophylized and stored at -18°C

Fig. 3. The procedure of antigen synthesis of zeatinriboside

로 구분된다.

표 1은 가장 대표적인 Freund's Adjuvant의 구성 성분을 나타내고 있다.

Table 1. Composition of Freund's Complete and Incomplete Adjuvants

Components	Complete	Incomplete
Mannide monooleate, 1.5 ml	+	+
Paraffin oil, 8.5 ml	+	+
<i>Mycobacterium butyricum</i> , 5 mg (killed and dried)	+	-

여기서 mineral oil은 소수성으로 antigen이 주사된 부위에 머물러 있게 하며 제면활성제는 수용상태의 antigen이 mineral oil방울의 내부에 존재하는 형태(water in oil)로 되게하여 면역조직과의 접촉이 천천히 일어나게 한다. 미생물의 시체는 면역 조직을 자극하는 역할을 한다.

Adjuvants와 antigen(0.9% NaCl 수용액)과의 혼합비율은 1:1(v/v) 정도로 한다. 혼합방법은 rapid mixing, sonification 등 여러가지가 있으며 혼합여부는 차가운 물의 표면에 방울로 떨어뜨려서 확인할 수 있다. 만약 혼합이 잘 이루어졌다면 첫 방울은 물표면으로 퍼지지만 다음방울부터는 물 표면이나 수중에 방울이 깨어지지 않는 상태로 존재하게 된다.

## 2. Antibody 생산

### 1) Injection

Antibody 생산을 위한 대상 동물로는 rabbit, goat, guinea pig, chicken, rat, dunkey, horse등이 실험 목적에 따라서 선택. 사용될 수 있으며 일반적으로 New Zealand White Rabbit가 많이 사용된다. 주사부위, 주사량 주사시기 등은 적절하게 조절

할<sup>1,2,3,4,5,9,14</sup>) 수 있으며 과량인 경우는 tolerance 를 일으킬 수 있다. 주사방법은 primary injection 인 경우 complete adjuvant 와 함께 주사하며 primary response 가 거의 끝난후 booster 로서 secondary injection 을 한다. Secondary injection 의 경우는 이미 면역조직이 자극되어 있는 상태이므로 incomplete adjuvant 와 함께 주사하며 주사량도 훨씬 줄여야 한다.

## 2) Serum collection

Antiserum(antibody)의 채취는 booster injection 으로부터 보통 1~2 주 후에 실시한다.

채취된 혈액은 5000xg, 15 분 정도로 원심분리하여 serum(antibody)을 채취한다. 이 때 너무 세게 원심분리를 하면 hemolysis (cell lysis)가 일어나므로 적절한 rpm 을 유지하여야 한다. serum (antibody)은 노란색에서부터 약간 핑크색을 띄며 매우 안정하여 -20~-70 °C 에서 수년간 보관이 가능하며 필요시 희석하여서 사용할 수 있으며 serum 의 상부가 지방분 때문에 혼탁해지는 경우가 있으므로 serum 의 채취는 24 시간 정도 굼긴후에 하는 것이 바람직하다.

## 3. 시료분석

### 1) Enzyme-linked immunosorbent assay의 기본원리 및 구성요소

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)의 기본원리는 한정된 antibody에 대하여 enzyme 으로 label 된 antigen 과 label 되지 않은 antigen 과의 경쟁적 결합에 의해서 이루어지며 이때 사용된 tracer 로서의 enzyme 이 무색의 substrate 를 분해하여 발색되는 colour 의 흡광도를 측정함으로써 수행된다. 그리고 구성요소로서는 solid phase (ELISA plate), buffer solution, enzyme, substrate 등이 있다.

#### (1) Solid phase

ELISA에서 solid phase 는 antigen 이나 antibody 를 부착, 고정하여 면역적으로 반응한 물질 과 반응하지 않은 물질을 분리하는 역할을 한다. 사용되는 재료는 polystyrene, polyvinyl, polypropylene 등이 있으며 면역반응물과의 결합력이 높고 다양한 종류의 면역반응물질을 흡착하여야 하며 흡착된 물질은 잘 떨어지지 않고, 흡착물의 변성을 유발시키지 않아야 하며 흡착의 재현성이 좋아야 한다.

#### (2) Buffer Solution

ELISA 에 사용되는 buffer 는 antibody 나 antigen 의 부착시 사용되는 coating buffer, 면역반응물의 희석이나 세척시 사용되는 washing buffer, peroxidase 의 substrate 용해시 사용되는 Citrate-phosphate buffer 등이 있으며 일반적으로 다음과 같은 buffer 들이 사용되고 있다.

#### ◎ Coating buffer

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59g  
NaHCO<sub>3</sub>, 2.93g  
NaN<sub>3</sub>, 0.2 g  
in water 1L pH 9.6  
실온에서 2주 보관 가능

#### ◎ Washing buffer

a. PBS-T(pH 7.2)	b. PBS-T(pH 7.4)	c. PBS-GM(pH 7.0)
NaCl 8.0g	Tris 2.4g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.84g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.2g	NaCl 8.0g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.85g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2.9g	KCl 0.2g	NaCl 17.5 g
KCl 0.2g	Tween20 0.5ml	NgCl <sub>2</sub> 0.01g
NaN <sub>3</sub> 0.2g		BSA 1.0 g
Tween20 0.5ml		Gelation 5.0 g

in water 1L

※ Peroxidase 가 효소로 사용될 경우 NaN<sub>3</sub>은 첨가하지 않는다.

#### ◎ 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.0)

0.1M citric acid (19.2g/l)	24.3ml
0.2M phosphate (28.4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /l)	25.7ml
H <sub>2</sub> O	50ml

### (3) Enzyme and Substrate

ELISA에 사용되는 enzyme 은 alkaline phosphatase, peroxidase 및 β-galactosidase 등이 있다.

Substrate 는 분해되기 전에는 무색 (colorless) 이지만 enzyme 에 의해서 분해되면 강하고 안정된 색을 발해야 한다. 각 enzyme 과 사용되는 substrate 를 알아보면

◎ Alkaline phosphatase: Substrate 는 P-nitrophenyl phosphate 가 사용되며 사용직전 1 mg/ml (coating buffer pH 9.6 containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>) 의 농도로 만들어서 0.2ml/well 의 양으로 사용하며 반응은 3M-NaOH 로 정지시킨후 405~410nm 에서 흡광도를 측정한다.

◎ Peroxidase: O-phenylenediamine(OPD), 2,2'-azino-bis(3-ethyl benzothiazolin-6-sulponic acid diammonium salt(ABTS), O-tolidine, 5-aminosalicylic acid(5AS) 등이 substrate 로서 이

들은 모두 독성물질이므로 취급시 주의하여야 한다. ABTS의 경우 50mg을 100ml의 0.1M citrate-phosphate buffer에 녹여서 사용직전 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10μl를 첨가하여 0.2ml/well의 양으로 사용하며 415nm에서 흡광도를 측정한다. OPD는 40mg을 100ml의 0.1M citrate-phosphate buffer에 녹여 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40μl를 첨가하여 0.2ml/well의 양으로 사용한다.

OPD는 빛에 매우 예민하므로 사용직전에 제조하여야 하며 반응은 2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로서 정지시킨후 492nm에서 흡광도를 측정한다. 그림 4는 peroxidase에 대한 substrate들의 반응을 나타내고 있다.

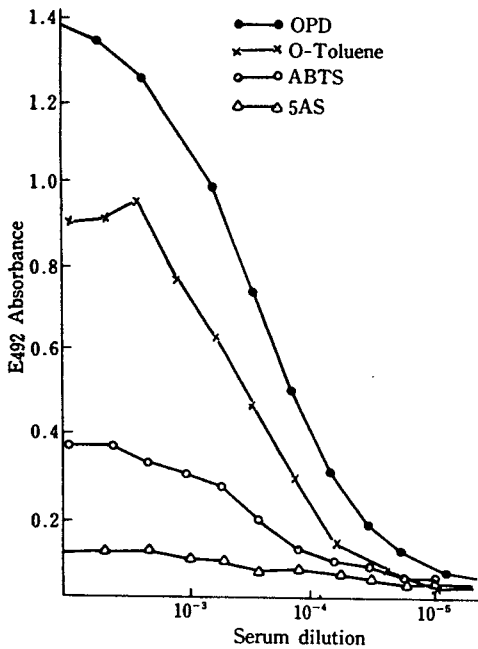


Fig. 4. Comparison of substrates for peroxidase (Voller 1979)

◎β-galactosidase: 2-nitrophenyl-β-galactopyranoside가 substrate로서 50mg을 0.1M sodium hydrogen phosphate buffer (pH 7.0) 100ml에 녹여서 사용하며 410nm에서 흡광도를 측정한다.

## 2) ELISA Procedure

효소면역학적 분석방법은 여러가지가 있지만 plant hormone의 분석시 일반적으로 다음 두가지가 이용된다.

### (1) The direct, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (EIA)

일반적으로 EIA로서도 표시되는 이 방법<sup>2, 7, 8, 12, 16)</sup>은 우선 분석하고자 하는 plant hormone을 tracer인 enzyme과 결합, label하여야 한다. 결합방법은 antigen 제조시 hapten (plant hormone)과 protein의 결합과 동일하며 plant hormone(antigen)과 enzyme의 결합체(Ag-E)가 형성된다. 그러나 이 때는 효소가 사용되므로 효소의 활성(Activity)가 떨어지지 않도록 주의하여야 한다. Ag-E가 완성되면 ELISA plate에 일정량의 antibody(Ab)를 부착 고정시킨다. 다음으로 plate에 Ovalbumin이나 BSA와 같은 protein 처리를 하여 antibody가 결합되지않은 plate의 표면을 coating함으로서 다음에 처리될 enzyme(Ag-E)과 plate 간의 직접적인 결합을 방지한다. 여기에 일정량의 Ag-E와 양을 구하고자 하는 Ag (standard or 시료)을 첨가함으로서 plate에 고정되어 있는 antibody에 대해 enzyme으로 label된 antigen(Ag-E)과 standard나 시료중의 free antigen(Ag)과의 경쟁적 결합이 일어나게 된다. 따라서 시료중의 free antigen(plant hormone)의 양에 따라서 고정되어 있던 antibody에 결합할 수 있는 Ag-E와 Ag의 비가 결정되어진다. 다음으로 Ab와 결합하지 못한 Ag-E와 Ag를 세척 제거한 후 substrate를 첨가함으로서 ELISA plate에 고정된 Ag-E의 양에 따라서 substrate가 분해, 발색정도가 결정되어지며 이에 따라 흡광도를 측정함으로서 구하고자 하는 Ag(plant hormone)의 양을 알아낼 수 있다. 그림 5는 이 과정을 나타내주고 있다.

### (2) The double-antibody, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

일반적으로 ELISA로 표시되는 이 방법<sup>3)</sup>은 우선 ovalbumin과 같은 protein과 plant hormone의 결합체(ovalbumine-Ag)를 만든다. 이 때의 결합법 역시 antigen의 제조시와 같다. 다음은 protein과 antigen의 결합체 일정량을 plate에 부착 고정시킨다. 여기에 일정량의 antibody(Ab)와 antigen (standard or 시료)을 첨가시켜 이 antibody에 대하여 plate에 이미 고정되어 있던 protein과 결합된 antigen과 첨가된 antigen (standard or 시료) 사이에 경쟁적 결합이 일어난다. 이 때 역시 첨가된 antigen의 양에 따라서 고정되어 있던 antigen과 첨가된 antigen과 결합되는 antibody의 비가 결정되어진다. 다음으로 세척과정을 통하여 plate에 고정되어 있던 antigen과 결합된 anti-

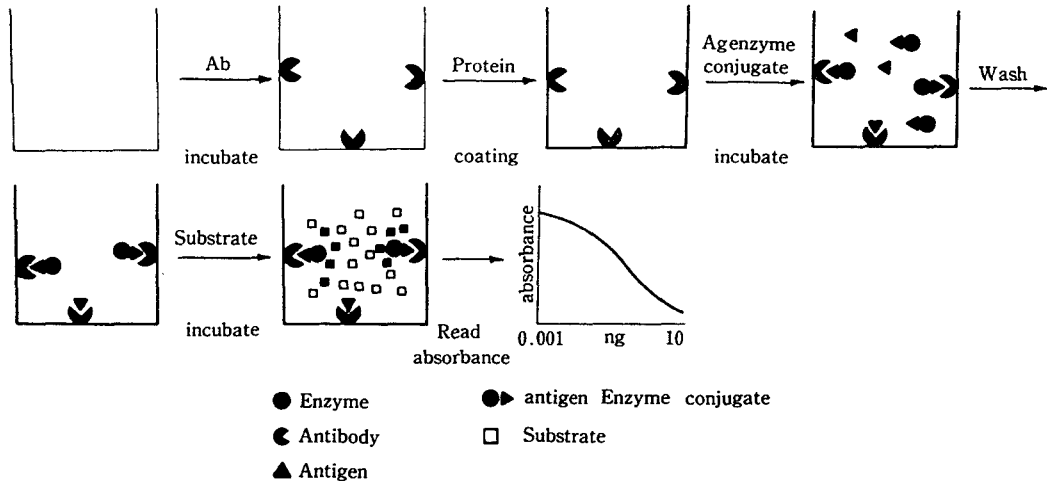


Fig. 5. The direct, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (EIA)

body 만이 남게 된다.

다음 단계로서 이때 사용되는 antibody 를 생산한 동물의 Immunoglobulin G(IgG)에 특이하게 작용하는 second antibody와 enzyme 의 결합체를 첨가한 후 substrate 를 처리하여 발색 흡광도를 측정하는 방법이다. 이 때의 second antibody 와 enzyme 의 결합체는 만들어서 사용할 수도 있지만 일반적으로 판매되고 있는 제품을 사용한다.

그림 6 은 ELISA 의 과정을 나타내고 있으며 그림 7 은 ELISA 에 의한 Zeatin 의 분석과정을 예시하고 있다.

이 방법은 plate 에 고정시 사용되는 Ag-protein

의 합성이 EIA 에서 Ag 과 enzyme 의 결합시처럼 enzyme 의 activity 를 유지시키기 위한 어려움이 없으며 antigen 을 plate 에 고정시킴으로서 antibody 의 회색배수를 증대시킬 수 있어 EIA 보다 더욱 specific 하고 sensitive 한 분석이 가능하다. 다만 incubation 과정을 한단계 더 필요로 하며, second antibody 와 enzyme 의 결합체가 필요하지만 시판되는 제품을 사용함으로써 쉽게 해결될 수 있다.

EIA 나 ELISA 모두 antigen 이나 antibody 의 plate 에 고정시는 carbonate/bicarbonate buffer (coating buffer) pH 9.6 을 사용한다. 이 경우 흡착, 고정은 매우 빨리 일어나 20~25°C 에서 1~2

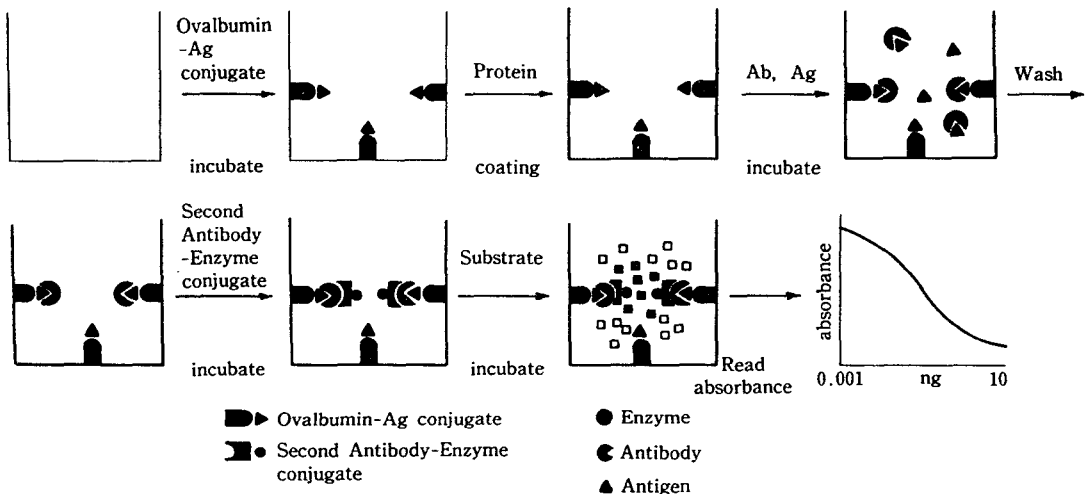


Fig. 6. The double antibody, indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

200  $\mu$  l of 200ng/ml (coating buffer) Zeatinriboside-Ovalbumin conjugate added to each well of a microtitre tray and incubated for 16h at 4°C

↓  
Tray was washed five times with washing buffer (PBS-T)

↓  
200  $\mu$  l of 0.25% ovalbumin added and incubated for 1.5h at 37°C

↓  
wash

↓  
mixture of 100  $\mu$  l standard or sample plus 100 $\mu$  l of antisera was added to each well and incubated for 1.5h at 37°C

↓  
wash

↓  
200  $\mu$  l of 1 : 1000 anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate was added and incubated for 2 h at 37°C

↓  
wash

↓  
200  $\mu$  l of 1mg/ml P-nitrophenol phosphate substrate in coating buffer (pH 9.6) was added

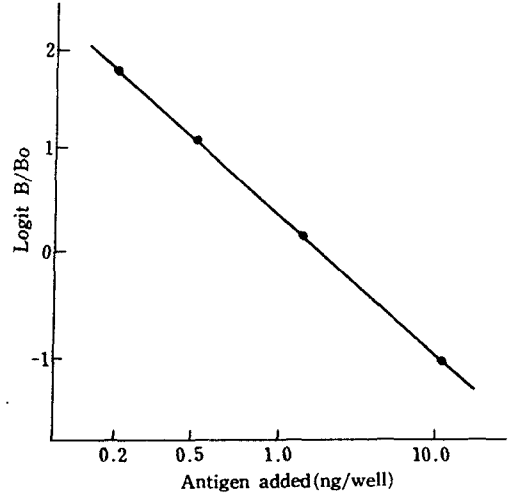
↓  
Absorbance read at 405nm after 30min

**Fig. 7.** The Procedure of ELISA for zeatinriboside

시간 내에 이루어지나 일반적으로 4°C에서 overnight 시키는 방법을 사용한다. 희석이나 washing은 PBS buffer (washing buffer)를 사용하며 세척은 3~6회 정도로 한다. 또한 효소면역학적법에 의한 분석은 enzyme의 반응에 의해서 이루어지므로 반응 시간이나 온도에 세심한 주의를 기울여야 한다. 정량과정은 흡광도의 측정에 의해서 그림 5와 6에서처럼 얻어진 sigmoid 형태의 흡광도 curve를 사용할수도 있지만 이를 다시 그림 8과 같은 logit form으로 변형시킨 standard curve가 일반적으로 사용되며 이를 통하여 구하고자하는 시료중의 plant hormone의 양을 알아낼 수 있다.

## 結 言

효소면역학적 분석법은 분석한계치가  $1 \sim 2 \times 10^{-14}$  mol 정도로서 RIA의 단점을 극복하며 생물검정법이나 물리화학적 분석법보다 고도로 sensitive하고 specific한 분석이 가능하다. 또한 복잡한 정제과정을 필요치 않으며 짧은시간에 다량의 시료를 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 반면 한 종류의



**Fig. 8.** Logit transformation of the standard curve.

$$\text{Logit } B/B_0 = \ell_n = \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$$

B = tracer bound in the presence of an antigen

B<sub>0</sub> = tracer bound in the absence of an antigen

성분을 분석하려면 antibody 생산과 같은 처음부터의 모든 준비과정이 필요하며 그 기간이 수개월씩이나 소요된다는 단점을 가지고 있다. 그러나 한번 생산된 antibody는 안정하여 수년간 보관이 가능하므로 Enzyme-linked immunosorbent assay는 식물호르몬 분석에 많은 편리함을 제공할 수 있을 것이며 더욱 발전의 가능성이 큰 방법이라고 생각된다.

## 引用文獻

1. Andrzej Madej and Per Haggblim. 1985. Radioimmunoassay for determination of indol-3-acetic acid in fungi and plants. *Physiol. plant.* 64 : 389-392.
2. Barthe, G.A., Ivan Stewart. 1985. Enzyme Immunoassay (EIA) of endogenous cytokinins in citrus. *J. Agric. Food chem.* 33 : 293-297.
3. Cahill, D.M., Weste, G.M., and Grant B.R. 1986. Changes in cytokinin concentrations in xylem extrudate following infection of *Eucalyptus maginata* Donn Ex Sm with phytophthora linnamomi rands. *Plant Physiol.* 81 : 1103-1109.
4. C.L. Diaz, P. lems-van kan. 1984. Determination of pea root lection using an enzyme

- linked immunoassay. *Planta* 161 : 302-307.
5. Daniel Walton, William Dashek and Eva Galson. 1979. A radioimmunoassay for ABA. *Planta* 146-139-145.
  6. Erlanger, B.F., Beiser, S.M. 1964. Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52 : 68-74.
  7. Hofman, P.J., Featonboy, B.C., and Staden J.V. 1986. The development of ELISA and RIA for cytokinin estimation and their application to a study of lunar periodicity in osbeck papenf. *J. Plant physiol.* 122 : 455-466.
  8. Jaleh Dalf and Roger Wyse. 1982. Adaptation of the ELISA to the quantitative analysis of ABA. *Analytical Biochemistry* 19 : 365-371.
  9. Lethem, D.S., Paker, C.W., and Rolfe, B. G. 1984. Quantitation of cytokinins in biological samples using antibodies against zeatinriboside. *Plant Physiol.* 75 : 1117-1125.
  10. Mark L. Brenner. 1981. Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann. Plant Physiol* 32 : 511-538.
  11. Rainer Atzorn and Weiler, E.W. 1983. The immunoassay of gibberellins *Planta* 159 : 1-6.
  12. Rainer Atzorn and Weiler, E.W. 1983. The immunoassay of gibberellins. *Planta* 159 : 7-11.
  13. Upper, C.D., Steele, J.A. 1978. Binding specificity and possible analytical applications of the cytokinin-binding antibody, anti-N<sup>6</sup>-benzyladenosine. *Plant Physiol* 62 : 968-974.
  14. Weiler, E.W. 1980. Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated ABA in plant extract. *Planta* 148 : 262-272.
  15. Weiler, E.W. 1980. Radioimmunoassay for transzeatin and related cytokinins. *Planta* 149 : 155-162.
  16. Weiler, E.W. 1982. An enzyme-immunoassay for cis-(+)-ABA. *Physiol. Plant.* 154 : 510-514.
  17. Yoram Fuchs and Shimon Mayak. 1972. Detection and quantitative determination of ABA by immunological assay. *Planta(Berl)* 103 : 117-125.